



## ***Nuevas Estrategias de Imagenología Molecular en Cáncer***

**MSc. Victoria Calzada**

Defensa de Tesis Doctoral en Química, Facultad de Química-PEDECIBA  
QUÍMICA

Tutores: Prof. Hugo Cerecetto, Prof. Pablo Cabral y Prof Thomas Quinn

JUNIO 2015

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
2.1 Imagenología molecular en cáncer.....	5
2.1.1 Imagenología y cáncer.....	5
2.1.2 Imagen óptica .....	7
2.1.3 Tomografía Computada de emisión de fotón único (SPECT).....	9
2.1.4 Tomografía de Emisión de Positrones (PET) .....	10
2.1.5 Imágenes multimodales .....	11
2.2 Agentes de imagenología molecular .....	12
2.3 Aptámeros .....	19
2.3.1 Antecedentes.....	19
2.3.2 Aptámeros en aplicaciones <i>in vivo</i> .....	21
2.4 Objetos de estudio .....	25
2.4.1 Sgc8-c .....	25
2.4.2 PTK7: blanco molecular del Sgc8-c .....	26
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivos específicos .....	30
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 Modificación de aptámeros .....	32
4.2 Radiomarcación.....	36
4.2.1 Marcación con Tecnecio-99m .....	36
4.2.2 Marcación con Galio-67 .....	37
4.2.3 Rendimiento de las radiomarcaciones .....	37
4.2.4 Purificación .....	38
4.2.5 Estabilidad .....	38
4.2.6 Coeficiente de reparto.....	39
4.3 Estudios <i>in vitro</i> .....	39
4.3.1 Citometría de flujo .....	39
4.3.2 Microscopia confocal.....	40
4.3.3 Unión a células de los radiomarcados.....	42

4.3.4 Inmunoreactividad.....	42
4.4 Estudios <i>in vivo</i> .....	42
4.4.1 Farmacocinética en ratas .....	42
4.4.2 Biodistribuciones.....	43
4.4.3 Estudios Imagenológicos .....	44
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 Modificación de aptámeros .....	46
5.2 Radiomarcación.....	50
5.2.1 Marcación con Tecnecio-99m .....	50
5.2.2 Marcación con Galio-67 .....	51
5.2.3 Purificación .....	52
5.2.4 Estabilidad de las marcaciones.....	54
5.2.5 Coeficiente de reparto.....	58
5.3 Estudios <i>in vitro</i> .....	59
5.3.1 Citometría de Flujo.....	59
5.3.2 Microscopia Confocal.....	75
5.3.4 Inmunoreactividad.....	77
5.3.3 Unión celular de radiomarcados.....	77
5.4 Estudios <i>in vivo</i> .....	82
5.4.1 Farmacocinética.....	82
5.4.2 Biodistribuciones.....	89
5.4.3 Estudios imagenológicos.....	103
5.4.3.1 Micro-SPECT-CT .....	118
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
<b>7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>129</b>
<b>8. PROYECTOS Y PUBLICACIONES.....</b>	<b>134</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>136</b>
<b>10. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>153</b>
<b>11. ANEXO.....</b>	<b>156</b>

## **1. RESUMEN**



La imagenología molecular es una disciplina que abarca innumerables herramientas. Entre sus aplicaciones se encuentra el diagnóstico *in vivo* del cáncer con agentes que reconocen marcadores tumorales y que a su vez poseen óptimas características para obtención de imágenes. Asimismo, proporciona información clínicamente fundamental, permitiendo una correcta selección del tratamiento a seguir y el monitoreo de sus efectos. Detalles como la localización, tamaño, morfología y cambios estructurales de un área afectada pueden ser detectados a través de los métodos convencionales de imagen. Sin embargo, técnicas de imagenología molecular como la SPECT, PET y FMT, entre otras, son cada vez más utilizadas.

Debido a su característica no invasiva la imagen molecular permite evaluar la patología en su contexto, siendo clave para entender el proceso tumoral, sin perturbar el ambiente y proporcionando información adicional a los métodos convencionales. La estadificación tumoral, detección de metástasis, cirugía guiada, así como la cuantificación de una lesión son diferentes aplicaciones en este área.

En este contexto, es muy importante el conocimiento de marcadores tumorales y el desarrollo de nuevos agentes de imagenología molecular específicos de estos.

Los aptámeros son oligonucleótidos (DNA o RNA) que tienen la característica de reconocer su blanco con alta afinidad y especificidad. Similar a los anticuerpos en estas características, los aptámeros presentan ventajas que los hacen interesantes para su aplicación como agentes de imagen o terapia.

El Sgc8-c es una secuencia truncada del aptámero sgc8, el cual muestra una unión específica y con alta afinidad al receptor PTK7. Sgc8-c tiene solamente 41 bases y una  $K_d$  de 0.78 nM para este receptor.

Si bien este receptor está presente en células normales, su sobreexpresión ha sido observada en cáncer de colon, tumores gástricos, cáncer de pulmón, próstata, mama e incluso en metástasis. Si bien, su participación en la oncogénesis parece ser clara, aun no es un receptor extensamente caracterizado.

El presente trabajo consistió en la investigación y desarrollo del aptámero Sgc8-c como agente de imagenología molecular en cáncer. Para ello Sgc8-c fue modificado en su extremo 5' con HYNIC, DOTA y se marcó con Tecnecio-99m y Galio-67 respectivamente. Asimismo el aptámero Sgc8-c fue marcado con Alexa647, para su evaluación como agente de imagen óptica en el infrarrojo cercano.

Todos los agentes desarrollados fueron evaluados fisicoquímicamente y frente a diferentes líneas celulares tumorales. Finalmente, las características de biodistribución y farmacocinética fueron estudiadas y tres modelos tumorales en ratón fueron seleccionados para realizar imágenes.

Molecular imaging is a discipline that involves many tools. One of its major applications is the *in vivo* diagnosis of cancer, using molecular probes that recognize tumor markers and have optimal characteristics for imaging. It also provides clinically important information, allowing the correct choice of treatment options and monitoring their effects. Details such as the location, size, morphology and structural changes of an affected area can be detected by conventional imaging methods. Moreover, molecular imaging techniques such as SPECT, PET and FMT, among others, are increasingly used.

Due to its minimal invasive characteristics, molecular imaging allows the evaluation of the pathology in context, being key to understanding tumor process without disturbing the environment and providing additional information to conventional methods. Tumor staging, detection of metastasis, guided surgery, as well as quantification of disease are different applications in this area.

In this context, knowledge of tumor markers and the development of new targeted molecular imaging agents is very important. Aptamers are oligonucleotides (DNA or RNA), which have the characteristics to recognize their target with high affinity and specificity. Similar to antibodies in their molecular recognition properties, aptamers offer advantages that make them interesting for use as imaging agents or therapy.

Sgc8-c is a truncated aptamer sequence, which exhibits specific binding and high affinity for the receptor PTK7. The Sgc8-c aptamer has only 41 bases, but its  $K_d$  for its receptor is 0.78 nM. Although this receptor is present in normal cells, its overexpression has been observed in colon, gastric tumors, lung, prostate, breast cancer and even their metastases. While participation in oncogenesis seems clear, the receptor needs to be characterized more extensively *in vivo* as a valid biomarker.

The work presented describes the research and development of aptamer Sgc8-c as a molecular imaging agent for cancer. Sgc8-c was modified at its 5' end with radiometal chelators HYNIC and DOTA and labeled with technetium-99m and gallium-67 respectively. Also, the Sgc8-c aptamer was labeled with the near infrared dye Alexa647 for evaluation as an optical imaging agent. All agents were developed and evaluated physicochemically against different tumor cell lines. Finally, the pharmacokinetics and biodistribution characteristics of the labeled Sgc8-c aptamer were studied and three mouse tumor models were selected for imaging.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## **2.1 Imagenología molecular en Cáncer**

### **2.1.1 Imagenología y cáncer**

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células [1]. Las mismas, sufren cambios y adquieren capacidades especiales diferentes respecto de las células normales, seguida de la proliferación descontrolada provocando la invasión, primero localmente y luego a distancia, de tejidos sanos del organismo [2,3]. Actualmente constituye la principal causa de mortalidad a nivel mundial afectando a casi el 25% de la población [4,5].

Datos de la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, en Uruguay, indican que en el año 2008 se registraron alrededor del 25 % de muertes por cáncer, siendo el cáncer de mama el que más afecta a la población femenina y el cáncer de pulmón en hombres [6].

El cáncer no constituye una enfermedad de causa única, sino que es el resultado de la sumatoria de múltiples factores entre los cuales se encuentran factores genéticos y ambientales, entre otros [7-10].

Debido a sus características heterogéneas el diagnóstico del cáncer se ha basado en parámetros clínicos y anátomo-patológicos [11,12].

La mayoría de los cánceres poseen altas tasas de sobrevida si se detectan precozmente. De esta forma, se ha demostrado que el factor pronóstico más poderoso está relacionado con la extensión de la enfermedad al momento del diagnóstico [13,14]. Sin embargo, es posible la remisión completa en algunos casos si se realiza una correcta selección del tratamiento, aun en estadios avanzados.

En función de ello, múltiples son las técnicas de imagenología utilizadas para el abordaje del cáncer. Mientras que las imágenes de tipo planar (rayos-X o gammagrafías) son exploradas desde el siglo pasado, fue recién en el año 1970 que se desarrollaron las imágenes en 3D [15].

La imagenología forma parte esencial de los protocolos clínicos, brindando información anatómica, fisiológica y funcional en forma no invasiva. Su rol ha consistido en ayudar a los profesionales a visualizar la ubicación y extensión de las zonas afectadas y su seguimiento tras la terapia, mientras que actualmente se extiende a evaluar aspectos asintomáticos, así como con el desarrollo de terapias personalizadas.

Los sistemas de imagenología clínica se basan en la interacción de radiación electromagnética con los tejidos [16,17]. Estos pueden ser agrupados según la fuente de donde deriva la información visual (rayos-X, positrones, fotones, ondas de sonido, etc.), la resolución espacial (macroscópica o microscópica) o el tipo de información obtenida (anatómica, fisiológica o molecular) [18].

Entre los sistemas de imagen macroscópica se encuentran las técnicas convencionales, como la tomografía computada (CT) y la Imagen de resonancia magnética (MRI) o el ultrasonido (US) y se puede adquirir información en donde es posible diferenciar una anatomía o fisiología normal de una anormal [18].

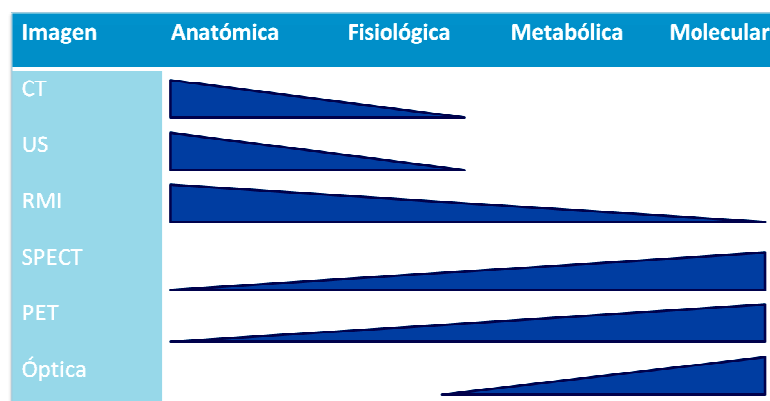
En la CT un tubo generador de rayos-X es la fuente utilizada. La exposición externa del paciente a los rayos-X y su la atenuación por los diferentes tejidos es lo que permite un alto contraste en las imágenes de las estructuras anatómicas. Es una excelente herramienta para estudiar estructura ósea, y algunos órganos internos [19].

La MRI también permite obtener imágenes con una muy alta resolución espacial. Sin embargo, un alto contraste en tejidos blandos permite diferenciar cambios anatómicos que no pueden ser observados por la CT, así como la evaluación de la permeabilidad y volumen vascular, perfusión de tejido y difusión de agua, entre otros. Su funcionamiento se basa en la interacción de un campo magnético externo uniforme con el tejido y pulsos de radiofrecuencia en un plano perpendicular al campo magnético que permiten recabar información a través del cambio en el flujo electromagnético [19].

Detalles como localización de una zona afectada, tamaño, morfología y cambios estructurales pueden ser vistos a través de la CT así como con la MRI y el US [15].

Asimismo, no dejan de ser menos importantes las imágenes que nos aportan otro tipo de información. Algunas de ellas como el SPECT (del inglés Single Photon Emission Computed Tomography), el PET (del inglés Positron Computed Tomography) y la FMT (del inglés Fluorescence-molecular tomography) son utilizadas hace ya varios años y detectan características moleculares de la patología [20,21] (Figura 1).

De aquí surge la imagenología molecular, un área multidisciplinaria que consiste en la visualización *in vivo*, caracterización y medida de procesos biológicos a nivel celular o molecular [22].



**Figura 1.** Representación del tipo de imagen que puede adquirirse para las diferentes tecnologías CT, US, RMI, SPECT, PET e imagen óptica.

Detectar características moleculares en forma no invasiva, a través de una imagen, permite evaluar la patología en gran parte de su contexto y es clave para la comprensión del proceso tumoral sin la perturbación del medio biológico, aportando de esta forma información complementaria a la obtenida por los métodos convencionales. Esto no solo ayuda a seleccionar un mejor tratamiento, sino que permite evaluar la progresión y respuesta al tratamiento en función de aspectos moleculares que se evidencian más precisa y rápidamente que otras variantes como por ejemplo la reducción del tamaño tumoral [23,24].

La estadificación tumoral, identificación de metástasis, las cirugías guiadas, así como la cuantificación de una lesión, son diferentes aplicaciones dentro de este campo [25-27]. A continuación se resumen las tres grandes técnicas de imagenología molecular.

### 2.1.2 Imagen Óptica

Las imágenes ópticas son sistemas que están basados en la interacción de los fotones con la materia y sus primeras aplicaciones provienen del año 1942 [28, 29].

La mayoría de ellos se basan en la capacidad que tienen ciertas moléculas de fluorescer. Esta característica consiste en la absorción de la luz a ciertas longitudes de onda y la emisión de luz a longitudes de onda mayor luego de un corto intervalo de tiempo.

En 1980, la utilización de fluoróforos en la región del infrarrojo cercano (NIR, 650-900 nm) cobró mayor importancia debido a que poseen ciertas ventajas en relación a otros para aplicaciones *in vivo* [30].

En dicho rango de longitudes de onda es posible generar imágenes con poca interferencia y se logran mejores contrastes debido a que las moléculas presentes en los tejidos, incluyendo la hemoglobina, el agua, lípidos y demás, no presentan grandes absorciones a las longitudes de onda en cuestión [31].

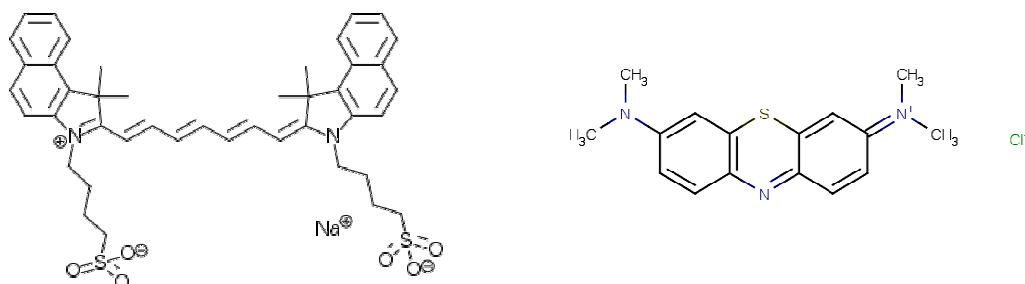
La autofluorescencia de tejido correspondiente a proteínas estructurales como colágeno y elastina, aminoácidos como triptófano, tirosina y fenilalanina, coenzimas como FAD, NADH y NADPH, porfirinas y demás, es también mínima entre esos valores [32].

Las imágenes por fluorescencia son poderosas herramientas, adaptables, y la penetración en el tejido en el rango de mm-cm. De esta forma se han adaptado a técnicas *in vivo* de imagenología molecular [33-35].

Una de las aplicaciones más recientes es la cirugía guiada por imagen en el NIR en donde a tiempo real, el médico visualiza específicamente las zonas afectadas tras exponer dicho tejido a una fuente de excitación adecuada [25, 36].

Algunas de estas aplicaciones ya son aprobadas para su uso clínico [37,38]. Asimismo, los fluoróforos aprobados actualmente para estos y otros usos por la FDA son la indocianina verde (o ICG) y el azul de metileno (o MB) (ver Figura 2) [39,40].

Entre las técnicas de imagenología molecular ésta se destaca por su bajo costo y que no utiliza radiación ionizante. Sin embargo, debido a la baja penetración en el tejido de fotones con esas energías y el alto ruido de fondo son pocas las aplicaciones *in vivo* que han pasado a clínica [41]. Aun así las ventajas persisten cuando de estudios en animales de experimentación se trata, con el fin de seguir procesos e identificar nuevos blancos tumorales, entre otros.



**Figura 2.** Estructura química de la indocianina verde (izquierda) y el azul de metileno (derecha).

### **2.2.3 Tomografía computada de emisión de fotón simple (SPECT)**

Las gammagrafías son una serie de metodologías que abarcan un gran número de técnicas. Como su nombre lo indica, se basan en la detección de la radiación gamma emitida por un radionucleido que ha sido previamente administrado al paciente.

Entre ellas se encuentran la imagen planar o, en su forma más moderna y tridimensional, el SPECT. Actualmente la tomografía de emisión del fotón único (o SPECT) es una de las modalidades imagenológicas más utilizadas en clínica.

El SPECT es una poderosa herramienta de imagenología molecular y permite detectar cantidades muy pequeñas del agente imagenológico, las cuales se estiman entre  $10^{-10}$  y  $10^{-11}$  M. Kuhl introdujo esta tecnología en 1963 [42].

Este tipo de imagen es adquirida tras la administración al paciente de un emisor gamma. Si bien existe una atenuación por los tejidos, la alta energía de esta radiación, permite ser detectada externamente.

Debido a que estas emisiones son direccionadas al azar, para mejorar la eficiencia de detección de los rayos gamma se utilizan una serie de colimadores que permitan determinar la incidencia de los rayos en forma externa. Un anillo cilíndrico de cristales de centelleo es asociado a una serie de fotomultiplicadores que traducen la señal y es integrada a través de un software para la reconstrucción de la imagen.

De esta forma se logra una resolución espacial de aproximadamente 12 x 12 x 12 mm [43].

Entre sus ventajas principales se encuentra que existen muchos radionucleidos emisores gamma disponibles y aprobados para uso en clínica. Asimismo, el equipamiento puede distinguir diferentes energías provenientes de radionucleidos distintos usados simultáneamente [44]. Su costo es relativamente bajo en comparación con otras metodologías similares. Si bien otras metodologías le superan en cuanto a resolución espacial los colimadores de tipo multi-pinhole y mejores diseños del equipamiento arrojan excelentes resultados [45,46].

Como se mencionó anteriormente, para el SPECT, se emplean radionucleidos emisores gamma, con un período de semidesintegración relativamente corto y una energía óptima de 30 a 300 keV que es detectada externamente.

En este sentido, los radionucleidos metálicos son de particular interés debido a su amplio rango de propiedades químicas y nucleares que permiten el desarrollo de una gran variedad de agentes imagenológicos. Entre ellos se encuentra el Tecnecio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) que es el radionucleido más empleado en Medicina Nuclear diagnóstica (ver Tabla 1).



La dosis de radiación es en general baja y si bien depende del radionucleido utilizado es similar a la que se obtiene en un estudio de CT abdominal [47].

**Tabla 1.** Resumen de radionucleidos emisores gamma. Información tomada de <http://ie.lbl.gov/toi/nuclide.asp?iZA=750186>.

Radionucleido (emisores gamma)	Decaimiento <sup>a</sup>	t <sub>1/2</sub>	E(γ) keV	Producción
<sup>99m</sup> Tc	TI	6.01 h	141	Generador
<sup>67</sup> Ga	CE	3.26 d	93, 185, 300	Ciclotrón
<sup>111</sup> In	CE	2.80 d	171, 245	Reactor nuclear
<sup>125</sup> I	CE	59.4 d	35	Ciclotrón
<sup>131</sup> I	TI, β	8.02 d	364	Reactor nuclear
<sup>177</sup> Lu	TI, β	6.73 d	208	Reactor nuclear
<sup>186</sup> Re	CE	3.72 d	137	Reactor nuclear
<sup>201</sup> Tl	CE	3.05 d	167	Ciclotrón
<sup>123</sup> I	CE, β+	13.1 h	159	Ciclotrón

<sup>a</sup> TI: transición interna; CE: captura electrónica; β: emisión beta; β+: emisión de positrones.

### 2.1.4 Tomografía de emisión de positrones (PET)

La Tomografía de Emisión de Positrones o PET es una herramienta muy utilizada en los últimos años y va cobrando cada vez más importancia. De forma similar al SPECT, en ella también se detecta la emisión gamma.

La diferencia con el SPECT radica principalmente en el tipo de radionucleido que se utiliza. Para PET son administrados al paciente agentes de imagen que portan en su estructura radionucleidos emisores de positrones (ver Tabla 2). Los positrones emitidos por el radionucleido recorren una pequeña distancia hasta que son aniquilados con electrones circundantes. A partir de una aniquilación se emiten dos fotones en direcciones opuestas y con energías de 511 keV [48].

El detector PET, dispuesto alrededor del paciente, capta la señal de la radiación gamma y la convierte en la imagen. En función de la dosis administrada, duración del estudio y la sensibilidad del detector y el escáner se logran obtener sensibilidades en el orden de 10<sup>-11</sup> a 10<sup>-12</sup> M. Sin embargo, desarrollar agentes de imagen molecular para PET no ha sido tan sencillo. Hasta ahora la aplicación clínica extendida es la de <sup>18</sup>F-FDG (2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa) [49,50].

La mayoría de los radionucleidos para PET son costosos de sintetizar además de que el extremadamente corto periodo de semidesintegración hace que sea necesario generar módulos automatizados de síntesis que lo hace aun más costoso [43].

**Tabla 2.** Resumen de radionucleidos emisores de positrones. Información tomada de <http://ie.lbl.gov/toi/nuclide.asp?iZA=750186>.

Radionucleidos (emisores de positrones)	Decaimiento	$t_{1/2}$	E( $\gamma$ ) keV	Producción
<sup>68</sup> Ga	$\beta^+$	67.6 min	511	Generador
<sup>18</sup> F	$\beta^+$	109.8 min	511	Ciclotrón
<sup>86</sup> Zr	$\beta^+$	16.5 h	511	Ciclotrón
<sup>11</sup> C	$\beta^+$	20.4 min	511	Ciclotrón
<sup>13</sup> N	$\beta^+$	10.0 min	511	Ciclotrón
<sup>15</sup> O	$\beta^+$	122.2 s	511	Ciclotrón
<sup>64</sup> Cu	$\beta^+, \beta$	12.7 h	511,	Ciclotrón
<sup>86</sup> Y	$\beta^+$	14.7 h	511	Ciclotrón
<sup>124</sup> I	$\beta^+$	4.2 d	511	Ciclotrón

Sin embargo, debido a su alta sensibilidad, penetración en el tejido, y capacidad cuantitativa, el PET es una poderosa herramienta para diagnóstico clínico de diferentes patologías e investigación básica en neurología, cardiología y oncología principalmente [51-53].

### 2.1.5 Imágenes multimodales

Si bien la CT o MRI poseen una alta resolución espacial proporcionando minuciosos detalles anatómicos, la apariencia entre una patología maligna y una benigna o una alteración postquirúrgica y una residual pueden confundirse con tan solo este tipo de estudios [54,55].

Por otro lado, la información funcional que nos brindan las técnicas de imagenología molecular como el SPECT, PET o FMT resulta en imágenes con una pobre resolución espacial en contraste con las anteriores mencionadas.

Las imágenes híbridas o multimodales consisten, entonces, en la integración de dos o más modalidades de imagen.

La conformación inicial consistió en sistemas en tándem basados en dos escáneres posicionados uno a continuación del otro y la fusión de las imágenes a través de un software adecuado [56].

Los sistemas más modernos o sistemas híbridos, consisten en un único sistema integrado de imagen que permite obtener toda la información en un único estudio [57]. Algunos autores lo llama “the best of both worlds” debido a que la combinación de la imagen estructural de alta resolución obtenida por los sistemas de imagen macroscópicos junto con la imagen fisiológica y molecular, o ambas, del tumor obtenida en combinación con otras modalidades integran los beneficios y potencian la utilización como una potente herramienta [15].

Es así que surgen las imágenes multimodales, una combinación o fusión de imágenes de diferentes modalidades, a través del co-registro de varias modalidades de imágenes o del uso de sistemas híbridos. El PET/CT [57, 58], SPECT/CT [59], son los más utilizados actualmente mientras que otros como el SPECT/RMN, PET/RMN [60], FMT/RMN FMT/CT [61, 62], son muy prometedores.

Los diferentes sistemas varían en sus propiedades físicas incluyendo la sensibilidad y la resolución espacial y temporal (ver Tabla 3).

El primer prototipo de PET/CT fue completado en el año 1998 [57]. Sin embargo no estuvo disponible en clínicas hasta el 2001 [63] siendo entonces un sistema que si bien ha tenido enormes avances, se ha desarrollado recientemente.

**Tabla 3.** Características de los sistemas de imágenes más comunes.

Modo	Resolución espacial	Penetración en tejido	Concentración en sangre del agente de imagen
CT	300 $\mu$ m	Ilimitada	50 $\mu$ mol/L
RMN	800 $\mu$ m	Ilimitada	10-100 $\mu$ mol/L
Ultrasonido	500 $\mu$ m	Ilimitada	50 nmol/L
SPECT	5-10 mm	Ilimitada	nmol/L-pmol/L
PET	2-8 mm	Ilimitada	nmol/L-pmol/L
Imagen óptica	1-5 mm	<1 cm	nmol/L-pmol/L

## 2.2 Agentes de imagenología molecular

Si bien la imagen es la reconstrucción visual que nos ayuda a determinar varios parámetros, detrás de todo este desarrollo se encuentran otros desafíos.

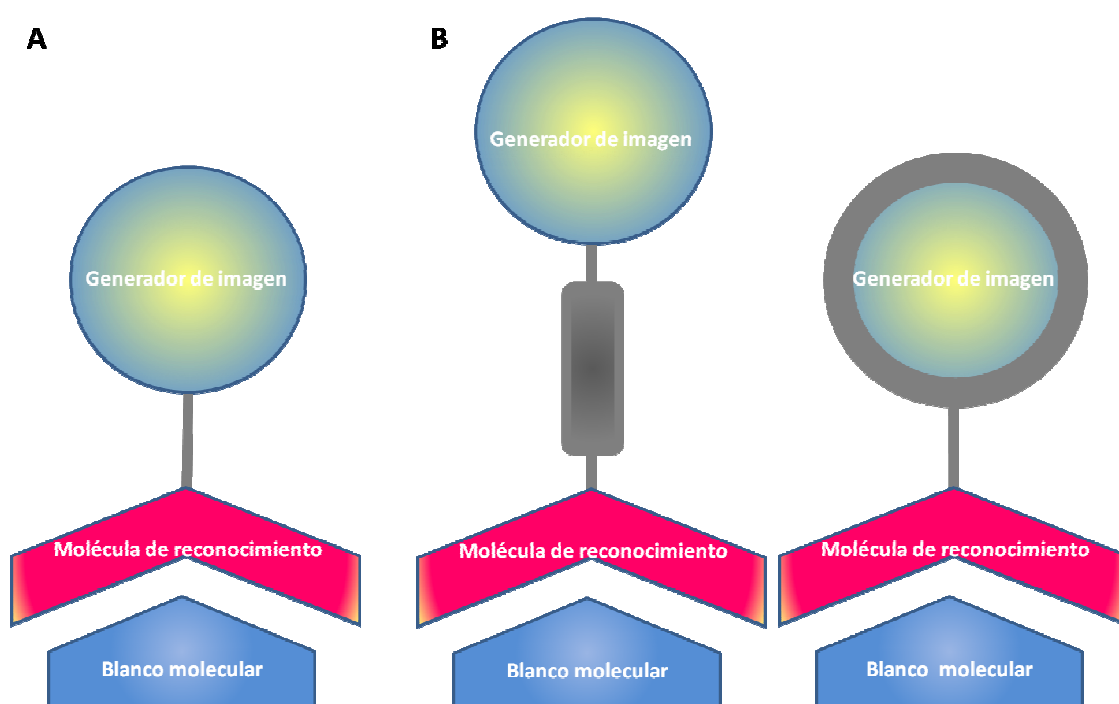
Un agente imagenológico actúa como trazador, ya que es administrado a bajas concentraciones de manera tal que no presentan ningún efecto farmacológico. Esto es lo que básicamente los diferencia de los fármacos convencionales en donde se busca intervenir en un proceso biológico particular.

Tras su administración al paciente el agente imagenológico se distribuye a través del organismo localizándose en las zonas afectadas. Luego, o mientras se produce la

acumulación en la zona afectada, las radiaciones son detectadas externamente para generar una imagen mediante procesamiento computarizado [64,65].

A diferencia de algunas técnicas imagenológicas convencionales en imagenología molecular se requiere no sólo del desarrollo de equipamiento de alta resolución, sino que de la identificación de nuevos blancos moleculares y del desarrollo de agentes imagenológicos específicos para estos [66,67].

En general, el agente de imagenología molecular consta de dos partes bien diferenciadas: la molécula biológicamente activa que determina el reconocimiento por su blanco y el generador de la imagen el cual emite radiación permitiendo la detección externa y la valoración del proceso en forma cuali- o cuantitativa [64] (ver Figura 3A).



**Figura 3.** Representación esquemática de un agente de imagenología molecular (A) y variaciones de los mismos (B).

Pequeñas moléculas, péptidos, proteínas, anticuerpos, oligonucleótidos y nanoestructuras pueden actuar como molécula de reconocimiento específico por un blanco molecular. Las características principales que se busca en ellos son la alta afinidad y especificidad por el blanco molecular.

Sin embargo, otros aspectos deben ser tenidos en cuenta a la hora del diseño de agentes de imagenología molecular. Una alta sensibilidad no solamente depende del equipamiento seleccionado sino de características propias del generador de imagen y su entorno que eviten perturbaciones y minimicen la señal emitida.

La estabilidad *in vivo* y la cinética de eliminación son las características que, junto con las anteriores, buscan obtener altas relaciones blanco/no blanco en la imagen [68].

Un aspecto fundamental en el diseño es que la incorporación de estructuras foráneas como átomos radiactivos o fluoróforos a moléculas biológicamente activas puede afectar enormemente sus propiedades. Esto puede evitarse tras la incorporación de un espaciador (ver Figura 3B), entre ambas partes, que actúa minimizando interacciones. A su vez, la flexibilidad, carga e hidrofiliidad pueden ser elegidos para modificar las características del agente imagenológico en su conjunto.

En la Tabla 4 se resumen las características deseables y tipos de blancos tumorales y de agentes de imagenología molecular.

**Tabla 4.** Resumen de características deseables de los blancos tumorales y de los agentes de imagenología molecular.

	Tipos	Características deseables
<b>Blanco tumoral</b>	Proteínas	Presente en tumores o presente en diferente cantidad que el tejido sano.
	ADN	
	Lípidos	Puede estar presente también en el microambiente tumoral o en vías linfáticas o sanguíneas.
	Carbohidratos	
	Toxinas	
	Hormonas	
<b>Agente de reconocimiento molecular</b>	Péptidos	Especificidad
	Proteínas	Afinidad
	Anticuerpos	Estabilidad
	Aptámeros	Rápida eliminación
	Nanopartículas	No inmunogénico ni tóxico
<b>Agente de imagen</b>	Radionucleidos	Amplificar la señal de reconocimiento.
	Fluoróforos	
	Agentes de contraste	Bajo ruido de fondo

La utilización de simples cadenas hidrocarbonadas o de secuencias poliaminoacídicas puede variar la lipofiliidad en su conjunto y de esa forma modificar la eliminación renal. Polilisina, poliglicina, o ácido aspártico pueden ser utilizados para aumentar la carga global de la molécula, tornándola más hidrofílica para disminuir la retención en los riñones. El polietilenglicol (PEG) puede utilizarse por ejemplo para incrementar la circulación sanguínea.

De esta forma toda modificación deberá ser evaluada a los efectos de evidenciar como afecta la actividad biológica de la molécula a desarrollar y que no sean inmunogénicos ni tóxicos.

Por ejemplo, la incorporación de fluoróforos a las biomoléculas, por ser en general grandes estructuras con anillos aromáticos, pueden cambiar enormemente la lipofilia de la molécula. La incorporación de átomos radiactivos metálicos requiere en general

de un conector con la capacidad de ser quelantes bifuncionales, los cuales deben ser cuidadosamente seleccionados para que coordinen al átomo metálico y por otro lado permitan la unión a un grupo funcional presente en la biomolécula [69].

Fundamentalmente estos deben formar un complejo termodinámicamente estable con el metal [69]. Esto se logra generalmente con el uso de quelantes polidentados y su elección depende principalmente del tamaño y geometría de coordinación del ion metálico [70].

El uso de quelantes bifuncionales y/o espaciadores dependerá entonces de las características que el agente imagenológico requiera para funcionar como tal.

Particularmente el tecnecio posee una química muy diversa y la gran variedad de estados redox permite aplicar diferentes estrategias en el uso de agentes quelantes. La estrategia de quelante preformado consiste en un método indirecto de marcación en donde un quelante bifuncional o precursor es conjugado a la biomolécula, previo a la incorporación del  $^{99m}\text{Tc}$ .

En la actualidad los complejos basados en tricarbonilo y sus análogos son ampliamente estudiados para este tipo de aplicaciones [71]. Debido a la configuración electrónica  $d^6$  de bajo espín del Tc (I), el  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$  es extremadamente estable sobre un amplio rango de pH y resulta en altos rendimientos de marcación [72-74].

A pesar de que las estrategias de marcación con formación de complejos tricarbonílicos son muy utilizadas en estudios de marcación con  $^{99m}\text{Tc}$ , en moléculas pequeñas es posible que las torne más hidrofóbicas. Esto afecta de manera muy importante la biodistribución de la molécula y por consiguiente su eliminación. Asimismo se necesitan altas temperaturas para lograr rendimientos considerables lo cual puede afectar la estabilidad de la biomolécula [75].

El ácido 6-hidracino nicotínico o HYNIC (ver Figura 4), es un quelante bifuncional utilizado para la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  que permite marcaciones sencillas y con buenos rendimientos sin alterar de manera importante las características de la biomolécula [76,77].

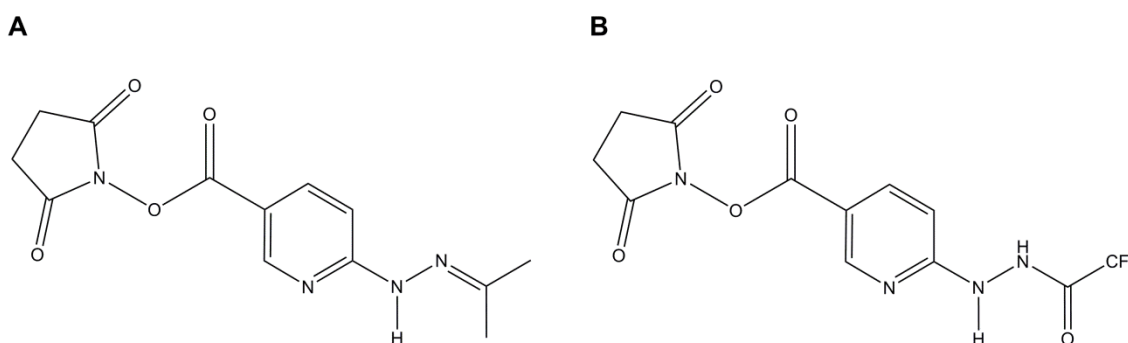
HYNIC ha sido utilizado para la marcación de péptidos [78] y proteínas [79,80], liposomas [81] y oligonucleótidos [82], entre otros. El agrupamiento responsable de la unión a biomoléculas es el ácido carboxílico que se encuentra en su forma activada, más reactiva, como éster *N*-hidroxisuccinimidilo (NHS-HYNIC, Figura 4), para formar un enlace peptídico con grupos amino como la lisina, en el caso de proteínas [76,88].

Por otro lado, el grupo hidracino libre del HYNIC presenta baja estabilidad en disolución [89]. Su estabilidad mejora sustancialmente si es almacenado como sal y protegido de la luz [90]. Debido a que el grupo hidracino es altamente nucleofílico, se requiere de protección ortogonal para impedir reacciones con electrófilos como el

mismo éster activado [91]. Sin embargo, las condiciones de desprotección deben ser compatibles con las condiciones óptimas de coordinación sin que la biomolécula pueda verse afectada [92]. Es así, que el agrupamiento hidracino se encuentra generalmente protegido, como se encuentra el reactivo que se comercializa (Figura 4A), como la hidrazona de acetona (derivado isopropilideno, NHS-HYNIC(Iso)). En nuestro laboratorio hemos desarrollado la síntesis de un NHS-HYNIC protegido, a nivel del grupo hidracino, como trifluoroacetato (NHS-HYNIC(Tfa), Figura 4B) que ha demostrado ciertas ventajas en el proceso de marcación que no las presenta el producto comercial [75,89,96]. Esta síntesis se ha conseguido mediante calentamiento con microondas y se ha realizado la marcación de biomoléculas como anticuerpos [95]. También han sido descritos, péptidos conjugados con HYNIC protegido a través de trifluoroacetilo que pueden ser eficientemente marcados con  $^{99m}\text{Tc}$ , en condiciones reductoras [93,94].

En este sentido, y dadas las ventajas en el uso de este nuevo derivado modificado, las suaves condiciones de temperatura y pH que se establecen al realizar la marcación y la estabilidad de los conjugados, es que HYNIC protegido a través de Tfa es un camino conveniente para la marcación con Tecnecio-99m de moléculas sensibles a condiciones de pH y temperatura y que serán almacenadas por ciertos períodos de tiempo [96].

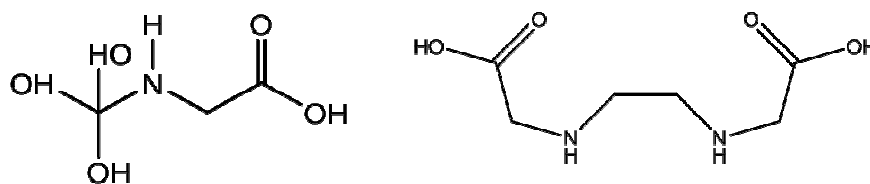
Algunos autores sugieren que HYNIC podría coordinar, en forma monodentada, con el tecnecio a través del nitrógeno hidracínico y otros proponen que coordina en un modo bidentado mediante los nitrógenos hidracínico y piridinílico. De esta forma, HYNIC puede ocupar uno o dos sitios de coordinación y por lo tanto necesita de un coligando para completar la esfera de coordinación con el Tecnecio-99m [83-85].



**Figura 4.** NHS-HYNIC con el grupo protector isopropilideno (HNS-HYNIC(Iso)) (A) y NHS-HYNIC con el grupo protector trifluoroacetato (HNS-HYNIC(Tfa)) (B).

Tricina, ácido etilendiamino acético (EDDA) o fosfinas son usados como coligandos (L) en su forma  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{HYNIC-biomolécula})(\text{L})_2]$ , si bien la estructura de los complejos

aun no están claramente elucidadas [70]. A su vez el uso de diferentes coligandos permite variar las propiedades fisicoquímicas [86,87] (ver Figura 5). Debido a que el Tecnecio-99m se obtiene de un generador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  la forma química de partida es el  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ , en donde el tecnecio se encuentra en su estado de oxidación +7. Para su coordinación con HYNIC y respectivos coligandos será necesaria su reducción con algún agente reductor como el  $\text{SnCl}_2$ .



**Figura 5.** Coligandos para  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , tricina (izquierda) y EDDA (derecha).

Por otro lado, en función de las propiedades y radios atómicos son necesarios otros quelantes bifuncionales para la variedad de radionucleidos metálicos que son utilizados actualmente.

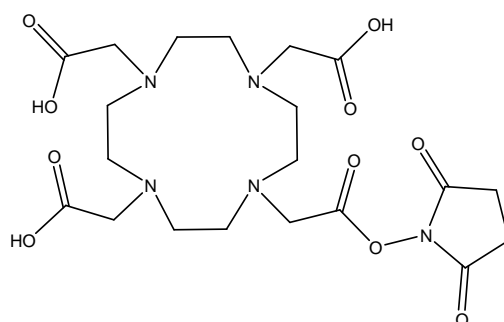
Los iones de metales lantánidos con radios atómicos grandes necesitan de 8 a 9 átomos dadores para completar la esfera de coordinación y en disolución se encuentran generalmente en su estado de oxidación +3. Su precipitación es posible en su forma de hidróxidos, fosfatos o carbonatos y por ello la coordinación debe darse evitando que ello suceda a pH levemente ácido [97].

Así, los policarboxilatos poliazamacrocíclicos forman complejos estables y en cortos tiempos [98]. Uno de estos el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N,N',N'',N'''*-tetraacético (DOTA) es un quelante que tiene muy buenas características, comparables con las de otros agentes muy utilizados como EDTA o DTPA [99].  $^{177}\text{Lu}(\text{III})$ ,  $^{68}\text{Ga}(\text{III})$ ,  $^{67}\text{Ga}(\text{III})$ ,  $^{111}\text{In}(\text{III})$ , entre otros radionucleidos, pueden ser quelados con muy buenas constantes de asociación con DOTA [99].

DOTA presenta una estructura cíclica con cuatro grupo carboxílicos y coordina a través de los cuatro nitrógenos amínicos y como máximo con tres oxígenos de los grupos carboxílicos dadores [100].

Como se muestra en la Figura 6, al igual que HYNIC, DOTA puede ser activado con un grupo éster *N*-hidroxisuccinidilo (NHS-DOTA) para ser utilizado en la marcación de biomoléculas como proteínas, péptidos, oligonucleótidos, etc. [70,101,102], formando un enlace amida.



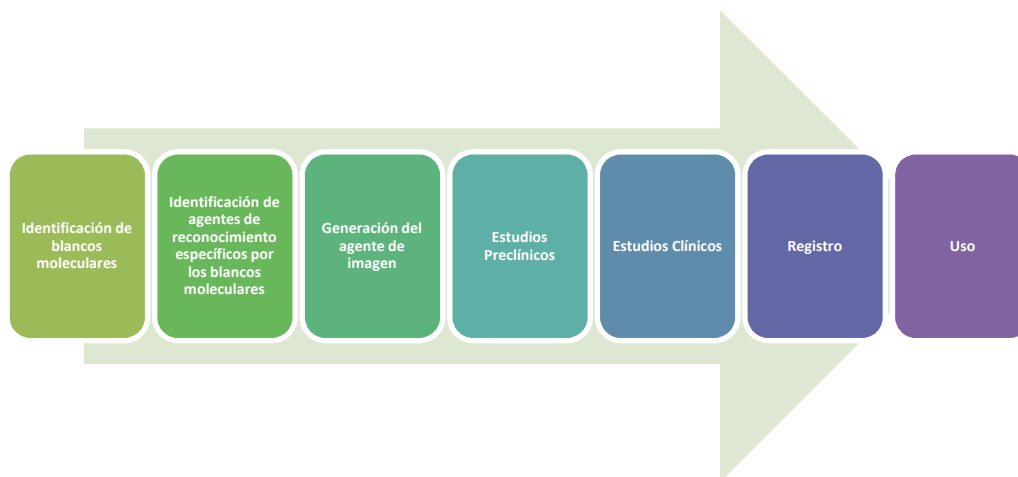


**Figura 6.** Estructura de NHS-DOTA

Como se mencionó anteriormente los esterios activados NHS pueden ser acoplados a aminas primarias de las lisinas o a grupos amino a través de un enlace amida con alta selectividad por aminas alifáticas. El pH óptimo de reacción, para NHS-DOTA, en sistemas acuosos es entre 8.0 y 9.0. Este enlace amida es muy estable en condiciones fisiológicas [77].

La estabilidad en el tiempo de estos intermedios con DOTA son muy elevados y las marcaciones son realizadas en condiciones levemente ácidas no siendo necesarias temperaturas altas en general. Preferentemente el radionucleido debe estar disponible en número de oxidación +3 lo cual se tiene bajo forma de cloruro, fácilmente obtenible. Sin embargo la disociación del complejo del metal de interés por la competencia de trazas metálicas presentes en la mezcla pueden interferir en el rendimiento de la misma por lo cual la calidad de las disoluciones utilizadas debe ser tal que prácticamente no hayan trazas metálicas.

Se ha estimado que un agente de imagenología molecular cuesta 150 millones de dólares en su desarrollo y que finalmente su aplicación en la clínica supera enormemente este valor [103]. Todas las variables deben ser tenidas en cuenta para asegurar la mejor calidad de imagen y resultados confiables al paciente (ver Figura 7).



**Figura 7.** Esquema de las etapas que debe cumplir un agente imagenológico para su uso plenamente aprobado.

## 2.3 APTÁMEROS

### 2.3.1 Antecedentes

La imagenología molecular depende en gran medida no solo del equipamiento adecuado sino del desarrollo de nuevos agentes de imagenología molecular. Diferentes tipos de biomoléculas son utilizadas para estas aplicaciones.

Los aptámeros son oligonucleótidos (ssDNA o RNA) con una estructura tridimensional caracterizada por bucles, tallos u horquillas [104-108] y tienen la capacidad de unirse a un blanco determinado a través de enlaces no-covalentes (van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas) con alta afinidad y especificidad. Estos blancos incluyen una variedad enorme de moléculas como toxinas, proteínas y péptidos, entre otros.

La historia de los aptámeros se remonta a Sol Spiegelman en 1960 junto con el advenimiento de la tecnología recombinante [109]. En 1990 Elington y Gold [110,111] profundizaron en la temática y fueron quienes le dieron el nombre de aptámeros.

Son seleccionados a través de complejas bibliotecas combinatoriales masivas mediante un proceso *in vitro* llamado Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (del Inglés SELEX). Esta técnica consiste en varias rondas de selección y amplificación a partir de una biblioteca de secuencias de ácidos nucleicos. Un gran pool de oligonucleótidos simple hebra ( $> 1 \times 10^{14}$ ) son incubados con el blanco molecular seguido de la remoción de las secuencias no unidas. Las

secuencias que poseen reconocimiento son aisladas y amplificadas por PCR o RT-PCR y el pool enriquecido es expuesto nuevamente a una nueva ronda de selección (aproximadamente 6-10 rondas de selección). Finalmente se realiza la secuenciación y caracterización individual de las variantes que presentan mayor afinidad [110,111].

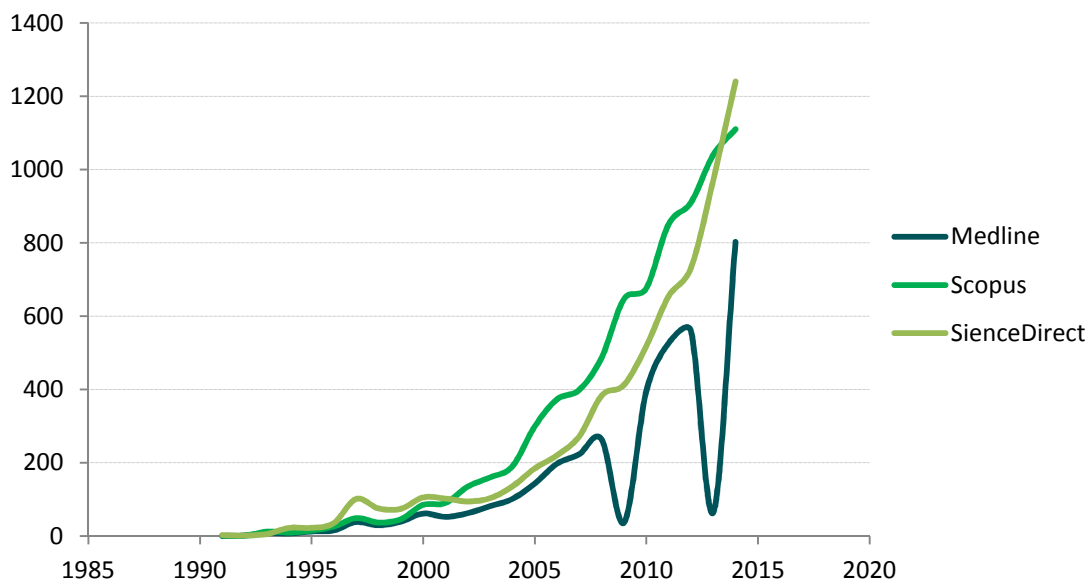
Incluso la utilización de nucleótidos no naturales permiten elevar la variedad y por lo tanto la posibilidad de obtener mejores resultados en lo que respecta a la afinidad [112].

Dicha técnica ha sido aplicada a un screening celular llamada Cell SELEX [113] lo que ha permitido no solo identificar aptámeros con gran potencialidad sino que también identificar nuevos blancos tumorales presentes en líneas celulares tumorales conocidas y establecidas [114]. Esta metodología ha sido incluso mejorada, llamada STACS (del Inglés Specific target cell selex) [115].

Entre sus aplicaciones se encuentran la cuantificación de la expresión de un blanco tumoral a través de biosensores, microscopía o citometría de flujo, localización celular de un blanco tumoral, entrega de fármacos e imagenología molecular. Sus usos vienen creciendo a pasos agigantados (ver Figura 8).

Jayasena describe a los aptámeros como los “rivales de los anticuerpos” [116]. Esto es porque los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos y otras moléculas convencionales de reconocimiento específico usadas comúnmente como fármacos o agentes imagenológicos.

El proceso *in vitro* de síntesis química y selección de los aptámeros es rápido, de bajo costo y posee menor variabilidad, en comparación con la de anticuerpos. Asimismo no generan inmunogenicidad y no son tóxicos [117]. Por otro lado, son de bajo peso molecular (~15000 Da) y pueden ser fácilmente modificados para incrementar su estabilidad biológica.



**Figura 8.** Publicaciones en el período 1985-2015 cuyas una de sus palabra clave es *aptámero*.

Aunque poseen carga polianiónica se ha demostrado que los aptámeros pueden ser internalizados en organelos intracelulares [118,119].

Macugen (pegaptanib sodium injection; Eyetech; OSI pharmaceuticals, Melville, NY) es la primera formulación de aptámeros aprobada para uso clínico por la FDA y se emplea en el tratamiento de la degeneración neovascular macular de la edad al inhibir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [120].

Actualmente existen varios estudios llevándose a cabo en fase clínica [121,122].

Debido a sus características los aptámeros pueden ser utilizados como agentes de imagen molecular y terapia.

### 2.3.2 Aptámeros en aplicaciones *in vivo*

Los aptámeros de elección como agentes de imagenología consisten en rangos de peso molecular de entre 10-15 kDa. Los valores de afinidad que se logran obtener se acercan a los obtenidos para anticuerpos enteros. Sin embargo su tamaño les otorga una rápida penetración en los tejidos, así como una rápida eliminación del organismo. Así, se logran entonces relaciones blanco/no blanco mucho más elevadas [123,114].

La primera aplicación de aptámeros como agentes de imagenología molecular fue realizada marcando con  $^{99m}\text{Tc}$ . Un aptámero que se une específicamente a la tenascina-C fue marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  y estudiado en tumores xenógrafos encontrándose relaciones tumor sangre de 50:1 a las 3 h [124]. No se han descrito respuestas inmunes en sus aplicaciones *in vivo* [117].

Los aptámeros prometen enormes ventajas en comparación con los típicos péptidos y anticuerpos (ver Figura 9)

Estas características proporcionan indicios de que la marcación de aptámeros podría ser un buen camino para imagenología de tumores (ver Tabla 5).

Desde que los aptámeros han demostrado prósperos resultados sus aplicaciones en imagenología molecular se han extendido a técnicas como imagen óptica con fotones en el infrarrojo cercano de penetración por arriba de 800  $\mu\text{m}$  [125-127], RMN [123,128], CT [129], SPECT y PET [129-131], entre otras.

La estabilidad y la cinética de eliminación son dos características fundamentales que determinan la biodisponibilidad de los aptámeros *in vivo*. Si bien los aptámeros son menos susceptibles a la temperatura o pH que los anticuerpos el principal obstáculo consiste en evadir las exo- y endonucleasas presentes en plasma.

En este sentido es preferible la elección de aptámeros de tipo ADN debido a que el ARN es más fácilmente degradable. Se han descrito una variedad de modificaciones, post-SELEX principalmente a nivel de la ribosa que evitarían la degradación enzimática de los mismos (ver Tabla 6).



**Figura 9.** Comparación de ventajas tanto de los anticuerpos como de los aptámeros.

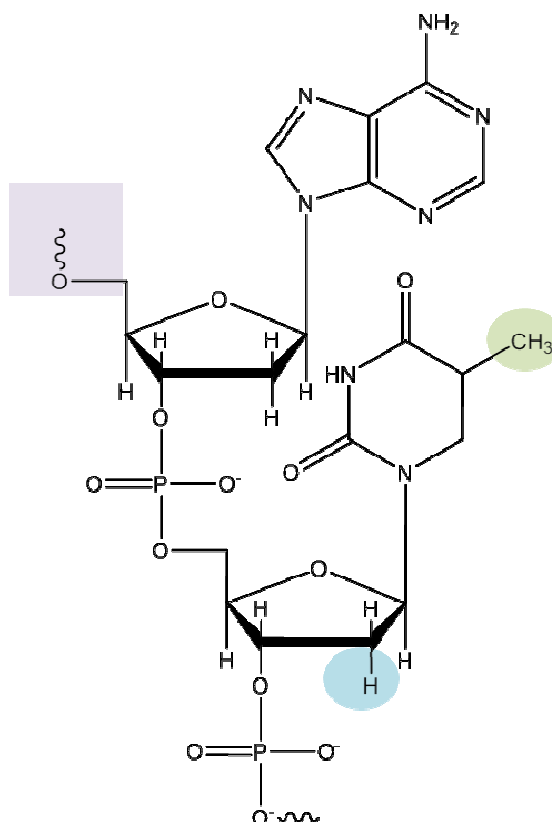
**Tabla 5.** Aptámeros descritos como agentes de imagenología molecular. Únicamente se incluye bibliografía que presenta estudios en animales.

Año	Agente de Imagen	Blanco	Tipo	Patología	Nombre	Autor	Imagen*	BD**
1997	<sup>99m</sup> Tc	Neutrófilo elastasa	ADN	Inflamación	NX21909	Charlton [124]	Si	No
2000	<sup>123</sup> I, <sup>125</sup> I	Trombina	ADN	Coagulación	-	Dougan [132]	No	Si
2004	<sup>99m</sup> Tc	Tenascina-c	ARN	Cáncer	TTA	Schmidt [133]	No	Si
2006	<sup>99m</sup> Tc	Tenascina-c	ARN	Cáncer	TTA1	Hicke [134]	Si	Si
2009	<sup>99m</sup> Tc	Muc1	ADN	Cáncer	AptA y AptB	Da Pieve [135]	No	Si
2009	<sup>67</sup> Ga	Nucleolina	ADN	Cáncer	MFR-AS1411	Hwang [123]	Si	Si
2010	NIR	mIgM	ADN	Cáncer	TD05	Shi [136]	Si	No
2011	<sup>64</sup> Cu	PSMA	ARN	Cáncer	A10-3.2	Rockey [137]	No	No
2011	NIR	PTK7	ADN	Cáncer	AAPsgc8	Shi [138]	Si	No
2012	<sup>99m</sup> Tc	hMMP-9	ARN	Cáncer	F3	Da Rocha [139]	No	Si
2013	NIR	Sin identificar	ADN	Cáncer	S6	Shi [140]	Si	Si
2014	NIR	PSMA	ARN	Cáncer	A9g	Dassie [141]	Si	Si
2014	<sup>99m</sup> Tc	CEA	ADN	Cáncer	Apt3 y Apt3-amino	Correa [142]	No	No
2014	<sup>188</sup> Re	EGFRvIII	ADN	Cáncer	U2	Wu [143]	Si	Si
2014	NIR	CD30	ARN	Cáncer	Anti-CD30	Zeng [144]	Si	No
2014	NIR	Sin identificar	ADN	Cáncer	Cy-Apt20	Cao [145]	Si	No
2014	<sup>64</sup> Cu	Nucleolina	ADN	Cáncer	AS1411	Li [146]	Si	Si
2014	<sup>99m</sup> Tc	Her2	ARN	Cáncer	Anti-Her2	Varmira [147]	No	Si
2015	<sup>99m</sup> Tc	Her2	ARN	Cáncer	Anti-Her2	Varmira [148]	No	Si

\*Se refiere a imagen *in vivo* de un animal

\*\*BD corresponde a estudios de biodistribución en animales sanos o enfermos.

Los aptámeros pueden también modificarse químicamente con fragmentos derivados de PEG para modificar las propiedades farmacocinéticas y estudiar de esa manera las diferentes aplicaciones [149]. De la misma forma los aptámeros podrían ser derivatizados con agentes quelantes y marcados por una gran variedad de radionucleidos emisores gamma y de positrones (ver Figura 10).



**Figura 10.** Esquema de cadena de ADN en donde se observa coloreado los grupos que más comúnmente son modificados químicamente para mejorar sus propiedades.

Si bien las modificaciones post-SELEX pueden afectar enormemente la afinidad por el blanco cualquiera de las modificaciones pueden afectar la lipofilidad y la carga del aptámero. Sin embargo algunas de ellas parecen no interferir de manera importante. En resumen los aptámeros reúnen las ventajas de ambos, péptidos y anticuerpos, para su exitosa aplicación en imagenología molecular [106,149,150].

**Tabla 6.** Posibles modificaciones que se pueden realizar sobre los aptámeros [151-155]

Modificaciones pre-SELEX		
Esqueleto	Ácidos nucleicos modificados (PNA, XNA, BNA, LNA, FNA)	Mejorar afinidad
Modificaciones post-SELEX		
Bases	Bases no naturales (Ds y Px)	Aumentar variabilidad en la selección
Conformación	Spielgermos	Mejorar reconocimiento por el blanco
Esqueleto	Hexaetilen glicol	Sustitución de secuencias del loop
Ribosas	2'amino	Estabilización contra nucleasas
	2'fluoro	
	2'-O-metilo	
Conjugaciones adicionales		
	PEG	Mejorar características farmacocinéticas
	Quelantes bifuncionales	Agente de imagenología
	Fluoróforos	Agente de imagenología y cuantificación

## 2.4 Objetos de estudio

### 2.4.1 Sgc8-c

Sgc8 fue un aptámero seleccionado de una biblioteca de  $10^{15}$  secuencias de ssADN al azar al intentar generar moléculas de unión a células T de leucemia linfoblástica aguda [113]. El mismo mostró unirse con alta especificidad y afinidad a un blanco de superficie celular presente en células de T-ALL (CCRF-CEM, Jurkat, Molt-4, Sup-T1), AML (NB-4) y no así en células normales o células de linfoma y B-ALL (Ramos y Toledo, respectivamente) [114].

Tras realizar los ensayos correspondientes se evidenció que el Sgc8 tiene la capacidad de reconocer selectivamente el receptor PTK7. En el trabajo de Shangguan y colaboradores [114] se evidencia que el anticuerpo anti-PTK7-PE no compite por el Sgc8-PE, lo cual lo explican por la unión a diferentes sitios de reconocimiento [156].

Según estudios realizados posteriormente Sgc8 sería internalizado a través de endosomas al igual que el anticuerpo anti-PTK7. La internalización ocurre luego de la unión a la proteína blanco por lo que es un proceso receptor-dependiente en el cual una pequeña región de la membrana se invagina para formar una vesícula intracelular. Asimismo fue evaluado que Sgc8 posee mínima citotoxicidad a altas dosis [157].

Finalmente, se estudió Sgc8-c, el cual es una secuencia truncada del original Sgc8, que mostró la misma capacidad de unión al blanco. Sgc8, el aptámero de 88 bases,



posee una  $K_d$  de 0.8 nM mientras que Sgc8-c con solamente 41 bases tiene una  $K_d$  de 0.78 nM (ver Figura 11) [158].

Más adelante Sgc8-c fue conjugado a la doxirubicina por el mismo grupo comprobándose que se conservaban sus características *in vivo* [159].

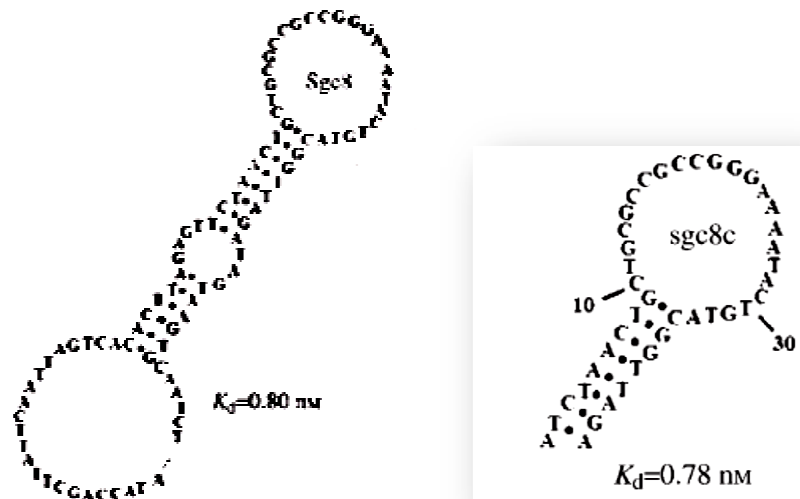


Figura 11. Aptámero Sgc8 y su fragmento Sgc8-c

### 2.4.2 PTK7: blanco molecular del Sgc8-c

Los receptores de tirosinquinasa (RTK) constituyen el mayor grupo de receptores de membrana los cuales responden uniéndose al ligando a través de la modulación de la actividad catalítica de su dominio quinasa intracelular. Están involucrados en el control de una amplia variedad de procesos celulares, incluyendo el ciclo celular, metabolismo, supervivencia celular y diferenciación, entre otros.

Los RTK son los mayores mediadores en señales intracelulares en organismos multicelulares. Su función en el desarrollo es extremadamente importante y su alteración está asociada a una gran cantidad de patologías [160].

Son generalmente proteínas grandes, que contienen entre 800 y 1600 aminoácidos, y se extienden en tres regiones bien características. Poseen un único dominio transmembrana y el dominio quinasa en la en el extremo C-terminal que es muy conservado y se extiende en la región intracelular. El dominio N-terminal se encuentra hacia en región extracelular y es responsable de la unión al ligando, por lo cual es altamente variable.

Los RTK pueden subdividirse en varias familias en función de la similitud del dominio tirosinquinasa, del dominio extracelular o su organización a nivel génico. En su dinámica y tras la unión al ligando el receptor dimeriza y fosforila residuos tirosina en los dominios intracelulares. Esto genera una cascada de señales a nivel intracelular que deriva en una gran variedad de cambios celulares [161].

PTK7 (del inglés Protein Tirosin Kinase 7) fue identificado en células de cáncer de colon por lo que recibía el nombre de *Colon Carcinome Kinasa* (CCK4) [162].

Este receptor está altamente conservado en diferentes especies [162] y consiste en siete dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, una región transmembrana y un dominio catalíticamente inactivo de tipo tirosinquinasa [163-164]. La pérdida del dominio triplete DFG hace que tenga esta característica por lo cual también es considerado una pseudoquinasa [165].

Si bien aun no se han identificado ligandos específicos y carece de actividad quinasa, queda claro su rol esencial en la sobrevivencia de los organismos.

Su rol en el desarrollo neuronal y polaridad celular en vertebrados fue evidenciado desde 2004 [166,167] y en los movimientos morfogénicos durante el desarrollo embrionario [168-170].

En condiciones normales ha sido demostrado que PTK7 participa en señales de polaridad celular involucrando proteínas como Wnt así como Plexinas, Semaforinas, RACK1 B-Catenina y demás. Todas estas vías de señalización están involucradas en el desarrollo embrionario. Sin embargo, PTK7 pareciera tener un rol muy importante en la migración e invasión endotelial de células tumorales [171,172].

También ha sido descrita que su participación no sólo está confinada a tejidos epiteliales [173] sino que se encontraron un grupo de células progenitoras mieloides induciendo señales promigratorias y antiapoptóticas.

**Tabla 7.** Resumen de las isoformas de PTK7, adquirido de <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PTK7ID41901ch6p21.html>.

	mARN	Perdida de exones	AA	PM(kDa)	Estructura
Isoforma 1	3213 pb	-	1070	118,5	Entero
Isoforma 2	3093 pb	10	1030	114	Pérdida de parte del loop Ig6
Isoforma 3	3045 pb	8, 9, 10	1014	103,7	Pérdida de loop Ig5, y parte del Ig6
Isoforma 4	2823 pb	12, 13	940	112,4	Pérdida de loop Ig7
Isoforma 5	2451 pb	16-10	816	90	Pérdida de dominio tirosinquinasa

El gen PTK7 humano está localizado en una región (6p21.1-p12.2) y deleciones y duplicaciones han sido encontradas en pacientes con diferentes patologías [174].

La sobreexpresión del receptor ha sido observada en varios tumores como de colon [175,176], gástricos donde ha quedado bien diferenciada la relación a una mayor supervivencia y periodo libre de enfermedad [177], de pulmón [178], de próstata [179], cáncer de mama y metástasis [180,181].

Un estudio reciente en células de cáncer de colon acerca de la apoptosis estudió el rol de las caspasas, particularmente de la caspasa 10 a través de la vía de señalización mitocondrial y no dependiente de p53. Tras el silenciamiento génico de PTK7 se redujo la viabilidad celular más del 90 % luego de 4 días [182]. De allí se deduce que PTK7 estaría involucrada en la promoción de migración y supervivencia celular. Por el contrario carecer de este receptor parecería terminar en la apoptosis celular. Este rol aún no está completamente estudiado.

Aún no se han dilucidado exactamente cuáles son las moléculas participantes y en que vías de señalización intervienen. Al parecer podrían participar heterodímeros [183]. Se ha descrito como co-receptor de Wnt confiriendo especificidad en la respuesta a los ligandos de Wnt [184]. Trabajos recientes revelan la proteólisis de PTK7 por MT1-MMP el cual está implicado en cáncer [185-187]

Se estudió que PTK7 promueve la angiogénesis así como la migración celular e invasión en células endoteliales activando KDR por la estimulación de VEGF [188]. Asimismo PTK7 podría formar heterodímeros con VEGFR1 favorecido por VEGF-A y promover así la migración y formación de tubos durante la angiogénesis. PTK7 es esencial en la activación de VEGFR1. Las vías de señalización implicadas en estas interacciones fueron FAK y Akt [189].

Se han detectado dos isoformas de PTK7 en ratón, una de 100 y otra de 140 kDa [166], sin embargo en humanos Ptk codifica 5 variantes por splicing alternativo (ver tabla 7) [190]

Su presencia en leucemia linfoblástica aguda de células T (T-ALL) fue puesta en evidencia al aplicar Cell-SELEX para la selección de un aptámero [114]. Un grupo de muestras provenientes de pacientes fueron evaluadas en PTK7. Se detectó que PTK7 estaba expresado en células progenitoras hematopoyéticas CD34+ y un subgrupo de AML. La línea eritroide, granulocítica, monocítica, precursora de células B y células B y T maduras no mostró significativa expresión de PTK7. Por lo tanto este receptor es considerado un marcador tumoral e inmunofenotípico para leucemia aguda y el incremento de resistencia a la apoptosis en leucemia [191]. Asimismo se observó la sobreexpresión en medula en T-ALL y luego del tratamiento quimioterápico se mantiene la sobreexpresión pudiendo ser detectables residuales de T-ALL [192].

### **3. OBJETIVOS**

### 3.1 Objetivo general

Investigación y desarrollo de potenciales agentes de imagen molecular utilizando el aptámero Sgc8-c.

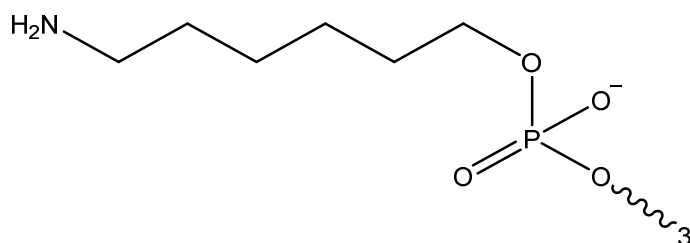
### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar las modificaciones químicas del aptámero Sgc8-c para sus diferentes aplicaciones:
  - Marcación con un derivado adecuado de Alexa674 a partir del aptámero Sgc8-c con un extensor de 6 carbonos y un grupo amino terminal.
  - Derivatización del aptámero con un derivado adecuado de HYNIC, a partir del aptámero con un extensor terminal de 6 carbonos y un grupo amino terminal. Posterior marcación con Tecnecio-99m.
  - Derivatización del aptámero con un derivado adecuado de DOTA, a partir del aptámero con un extensor terminal de 6 carbonos y un grupo amino terminal. Posterior marcación con Galio-67
- Evaluación fisicoquímica de los agentes desarrollados.
- Evaluación biológica, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los agentes desarrollados.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

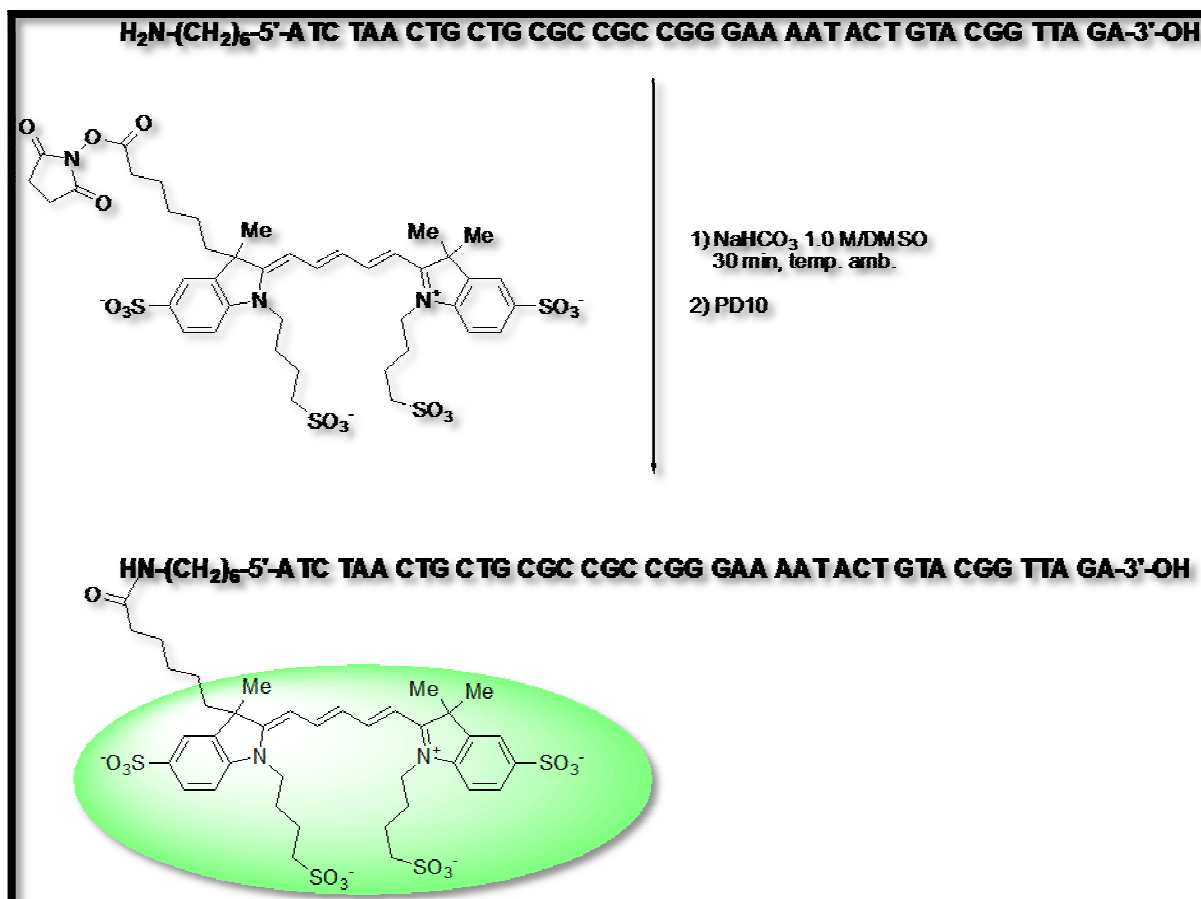
#### 4.1. Modificación de Aptámeros

El aptámero Sgc8-c (MM 12634 Da) de 41 nt con una secuencia original 5'- ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3', fue modificado por la incorporación de un grupo amino libre en su extremo 5'. El aptámero fue adquirido de Integrated DNA Technologies (IDT) junto con la incorporación del n espaciador de cadena alifática de 6 carbonos 5AmMC6 (ver Figura 12). Dicho aptámero quedó constituido de la siguiente manera 5'- /5AmMC6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3' con una masa molar final estimada por el proveedor de 12815 Da (ver anexo).



**Figura 12.** Grupo aminohexilo (5AmMC6) con el que se derivatizó el aptámero Sgc8-c en su extremo 5' para su posterior conjugación.

Para proceder a la conjugación con el fluoróforo Alexa Fluor® 647 (A-30009, ex/em=651/672 nm) en su forma de éster *N*-hidroxisuccidinimilo, el aptámero Sgc8-c-5AmMC6 se filtró con agua por microcon 10 kDa cutoff (Microcon® Centrifugal filters). Siguiendo el protocolo indicado de origen, el pH inicial fue ajustado con NaHCO<sub>3</sub> 1,0 M a pH=8,5. El fluoróforo fue disuelto en DMSO seco (<10 µL) y se incorporó a la mezcla de reacción conteniendo el aptámero Sgc8-c-NH<sub>2</sub>. La reacción se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz e inmediatamente se procedió a purificar por PD10 con agua MiliQ y esterilizada por autoclave. Una vez purificado, se controló la concentración por medida de la absorbancia a 260 nm y se fraccionó. Finalmente dichas fracciones del Sgc8-c-Alexa647 se liofilizaron y las muestras fueron almacenadas a -20 °C protegidas de la luz (ver Figura 13).



**Figura 13.** Esquema de reacción del aptámero Sgc8-c-5AmMC6.

Por otro lado, se realizó la conjugación del aptámero Sgc8-c-5AmMC6 con NHS-HYNIC(Tfa). El quelante NHS-HYNIC(Tfa) fue previamente sintetizado por nuestro grupo como se referencia anteriormente.

Para proceder con la reacción el aptámero Sgc8-c-5AmMC6 se filtró con agua por microcon 10 kDa cutoff. El pH de la mezcla fue ajustado a 8,5 con NaHCO<sub>3</sub> 1,0 M. Posteriormente un exceso 5 M de NHS-HYNIC(Tfa) (respecto al aptámero) fue disuelto el DMSO seco y se incorporó a la mezcla de reacción conteniendo el aptámero Sgc8-c-5AmMC6. La reacción se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad e inmediatamente se procedió a purificar por PD10 con agua MiliQ y esterilizada por autoclave. Una vez purificado se controló la concentración por medida de la absorbancia a 260 nm y se separaron fracciones.

Asimismo el aptámero Sgc8-c-HYNIC(Iso) fue adquirido a IDT, informando el fabricante que se realizó un procedimiento similar al descrito anteriormente para su modificación química. Para su fraccionamiento se filtró con agua por microcon 10kDa cutoff.



Finalmente, las fracciones del Sgc8-c-HYNIC(Iso) y Sgc8-c-HYNIC(Tfa) se liofilizaron y las muestras fueron almacenadas a -20 °C (ver Figura 14).

La reacción de conjugación del DOTA al aptámero Sgc8-c fue iniciada por el agregado del éster activado NHS-DOTA (Macrocyclics) en una relación 1:100 (aptámero:NHS-DOTA). Para ello, el aptámero disuelto en 0,1 M buffer bicarbonato de sodio/ buffer fosfato estéril, pH 8,5, fue mezclado con el NHS-DOTA disuelto en DMSO. La mezcla se incubó por 2 h a temperatura ambiente con agitación suave. Para frenar la reacción se purificó inmediatamente por PD10 con agua MiliQ y esterilizada por autoclave. Las muestras en fracciones fueron liofilizadas y almacenadas a -20 °C (ver Figura 15).

Todos los conjugados fueron analizados mediante HPLC (Agilent) en columna Kinetex® 5µm XB-C18 100 Å, 50 x 4.6 mm con 50 mM de TEAA (Amonio de Trietilamina), pH 7,5/ 5 % Acetonitrilo (A) y MeOH (B), velocidad de flujo 1 mL/min. El gradiente se realizó de A/B (90:10) a A/B (40:60) en 15 minutos.

Alguno de los conjugados fueron analizados por espectrometría de masas, QTOF MS (modo de detección de ión negativo), en un espectrómetro de masas Agilent 6520A. Las muestras fueron diluídas en buffer acetato de dimetilbutilamonio (DMBAA) 20 mM, pH 7,0-7,2, conteniendo 5 % de acetonitrilo. Los espectros de iones multiple-cargados fueron deconvolucionados con el programa *Maximum Entropy*.

Asimismo, otras masas fueron determinadas por espectrometría de masas por electroespray (ESI-MS) por la compañía *Integrated DNA Technologies*, en un espectrómetro de masas MS-IALTQ-08.

Los aptámeros modificados se resumen en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Resumen de aptámeros utilizados con las modificaciones realizadas.

Aptámero	Secuencia
Sgc8-c-NH <sub>2</sub>	5'- /5AmMC6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'
Sgc8-c-Alexa647	5'- /Alexa647/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'
Sgc8-c-HYNIC(Iso)	5'- /HYNIC(Iso)/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'
Sgc8-c-HYNIC(Tfa)	5'- /HYNIC(Tfa)/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'
Sgc8-c-DOTA	5'- /DOTA/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'

## 4.2 Radiomarcación

### 4.2.1 Marcación con Tecnecio-99m

El radiomarcado de los aptámeros Sgc8-c adecuadamente modificados con Tecnecio-99m se realizaron utilizando tricina (Sigma) como coligando y  $\text{SnCl}_2$  como agente reductor. La mezcla de tricina y  $\text{SnCl}_2$  fue realizada en  $\text{NaCl}$  0,9 % para una relación molar final de 1:1:2 (aptámero/ $\text{SnCl}_2$ /tricina).

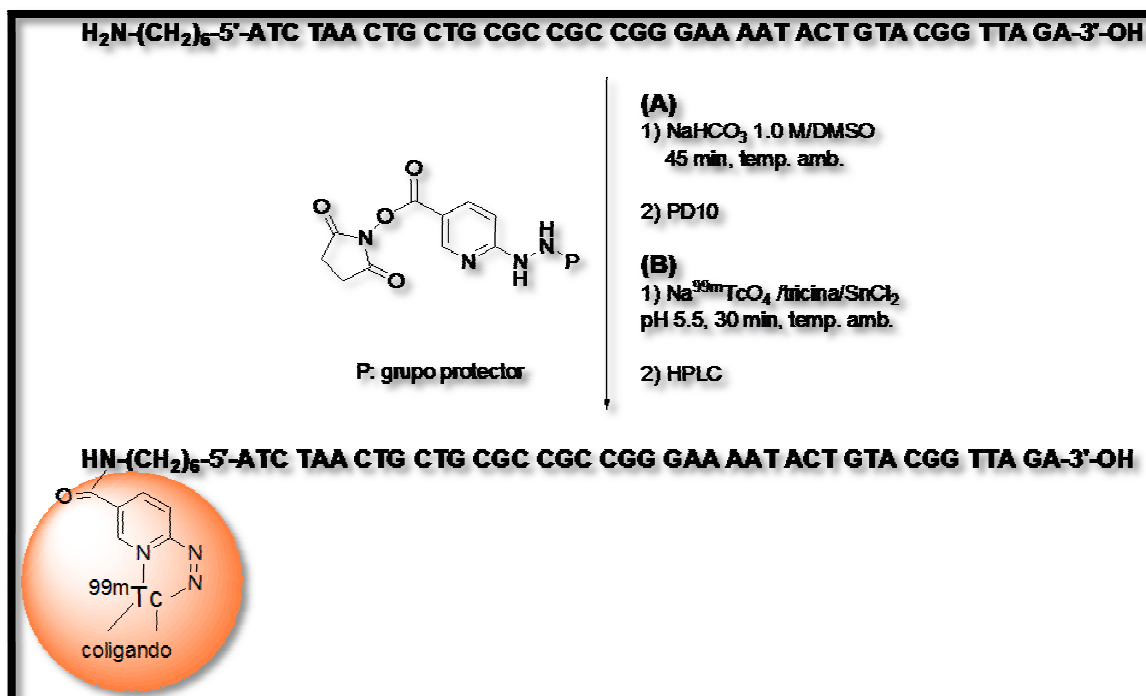
El aptámero liofilizado fue disuelto en la solución de  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  (proporcionada por el Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas). Posteriormente se incorporó la mezcla de coligando y agente reductor con un pH final de reacción de 5,5. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos (ver Figura 14).

El proceso de optimización de marcación fue realizado en estudios previos corroborándose que a 25 °C se obtienen los mejores rendimientos.

Fueron marcados con Tecnecio-99m tanto el Sgc8-c-HYNIC(Iso) como Sgc8-c-HYNIC(Tfa). Una actividad específica de 370 MBq/mg fue la máxima actividad específica ensayada.

Si bien en las condiciones de marcación el grupo protector se pierde la abreviación (Iso) y (Tfa) se usan para diferenciar de qué HYNIC proviene.

Todas las disoluciones y el material utilizado fueron preparados con agua MiliQ y esterilizados por autoclave previo a su uso.



**Figura 14.** Esquema de reacción del aptámero Sgc8-c-5AmMC6 con NHS-HYNIC-(grupo protector) (A) y posterior marcación con Tecnecio-99m (B).

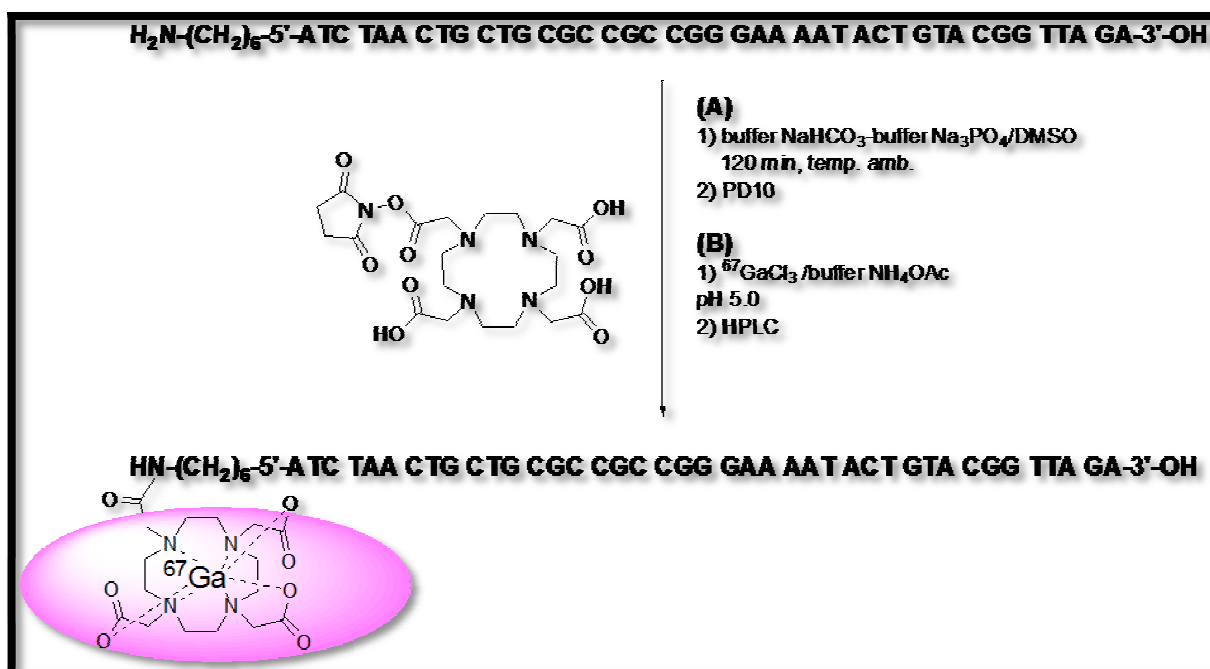
### 4.2.2 Marcación con Galio-67

El aptámero Sgc8-c-DOTA fue reconstituido en buffer acetato de amonio 0,1 M pH 5,0 y marcado con Galio-67 en la forma de  $\text{GaCl}_3$  (proporcionado por el Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas).

El pH final de la mezcla de reacción fue ajustado a 5,0 y se evaluaron diferentes actividades específicas. La máxima actividad específica evaluada fue de 450 MBq/mg (ver Figura 15).

Asimismo, se ensayaron variaciones tanto de temperatura de reacción como de tiempos de incubación.

Todas las disoluciones y el material utilizado fueron lavados previamente con agua MiliQ y esterilizados.



**Figura 15.** Esquema de reacción del aptámero Sgc8-c-5AmMC6 con NHS-DOTA (A) y posterior marcación con Galio-67 (B).

### 4.2.3 Rendimiento de las radiomarcaciones

Con el fin de evaluar los rendimientos de marcación y realizar la optimización de las mismas, todos los radiomarcados fueron analizados mediante HPLC.

Uno de los sistemas utilizados fue por RP-HPLC con columna C18 de 5  $\mu\text{m}$  (Kinetex) con 50 mM de TEAA pH 7,5/ 5 % acetonitrilo (A) y MeOH (B), velocidad de flujo 1

mL/min. El gradiente se realizó de A/B (90:10) a A/B (40:60) en 15 minutos, como se mencionó anteriormente para los conjugados.

También fueron evaluados con sistemas rápidos de cromatografía, utilizando como fase estacionaria ITLC-SG (Varian) y Whatman 1 MM (Whatman). Dichos sistemas se resumen en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Sistemas cromatográficos utilizados para el control de la pureza radioquímica.

Control	Fase estacionaria	Fase Móvil
Marcación con $^{67}\text{Ga}$		
1	ITLC-SG impregnada en BSA	acetato de amonio 0,1M
2	ITLC-SG	acetato de amonio 0,1 M
3	Whatman 1MM	MeOH
Marcación con $^{99\text{m}}\text{Tc}$		
1	ITLC-SG impregnada en BSA	EtOH:NH <sub>3</sub> :H <sub>2</sub> O
2	ITLC-SG	NaCl 0,9%
3	Whatman 1MM	MeOH

#### 4.2.4 Purificación

Para posteriores estudios fue necesaria la purificación de los radiomarcados. Para ello se evaluaron diferentes sistemas rápidos de purificación. Fue evaluada la purificación por PD10 y tubos de centrifuga microcon de 10kDa cutoff.

También fue utilizado el sistema de HPLC, con columna de exclusión molecular Protein Pak 300SW (Waters) en modo isocrático y flujo 1mL/min, con buffer fosfato 0,01 M como fase móvil.

#### 4.2.5 Estabilidad

Para estudiar la estabilidad en disolución, se realizó la incubación del radiomarcado puro en las disoluciones buffer de reacción. Sgc8-c-HYNIC(Iso)- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  como Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  puros fueron incubados en NaCl 0,9 % y Sgc8-c-DOTA- $^{67}\text{Ga}$  puro fue incubado con acetato de amonio 0,1 M. Las variaciones en la concentración inicial, estabilidad, se estudiaron mediante HPLC a 2, 4 y 24 horas post-incubación.

De la misma forma, Sgc8-c-HYNIC(Iso)- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y Sgc8-c-DOTA- $^{67}\text{Ga}$ , previamente purificados, se incubaron con 500 uL de suero fetal bovino (SFB, Sigma) a 2, 4 y 24 horas post-incubación. Inmediatamente las mezclas fueron filtradas por filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y controladas por HPLC en columna protein-pak.

## 4.2.6 Coeficiente de reparto

Se estudió el coeficiente de reparto para el aptámero Sgc8-c-Alexa647 y para los radiomarcados con Tecnecio-99m y Galio-67.

Para ello, una alícuota del aptámero se incubó en 1 mL de la mezcla 50 % octanol/50 % PBS (pH7,4) y se mezcló en un vortex por un minuto. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y posteriormente una alícuota de 200  $\mu$ L de cada fase se midió por separado.

En el caso del aptámero Sgc8-c-Alexa647 las fracciones de octanol y de PBS se midieron en el equipo de imagenología In-Vivo MS FX PRO y en el caso de los radiomarcados en el contador gamma PC-RIA.MAS Stratec.

## 4.3 Estudios *in vitro*

### 4.3.1 Citometría de flujo

Diferentes líneas celulares tumorales (American Type Tissue Culture, Manassas, VA) fueron analizadas por citometría de flujo con el conjugado Sgc8-c-Alexa647. Dicho ensayo fue realizado con células tumorales murinas A20 (ATCC® TIB-208™) y B16F1 (ATCC® CRL-6323™) así como también con células tumorales humanas CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™), Ramos (RA-1) (ATCC® CRL-1596™) y LS174T (ATCC® CL-188™). En la Tabla 10 se resumen las características principales de dichas líneas celulares. Las células se crecieron en distintos medios de cultivo (ver Tabla 10) provenientes de ATCC, todas en 10 % de SFB (ATCC) y con L-Glutamina 1 mM (Sigma-Aldrich). Tras su expansión fueron levantadas del cultivo, centrifugadas a 800 rpm por 5 min para remover el medio y posteriormente lavadas con PBS pH 7,4. Este último procedimiento se repitió dos veces. Cabe destacar que las células con crecimiento adherente fueron levantadas del frasco de cultivo mecánicamente utilizando un rastrillo para células con el fin de evitar el uso de tripsina- (Sigma). Aproximadamente 500000 células fueron incubadas con diferentes cantidades del Sgc8-c-Alexa647 en un volumen final de 0,5 mL. La suspensión de células fue incubada a 37 °C por 30 min. Luego de la incubación, el medio fue removido por centrifugación a 1000 rpm por 3 min. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas nuevamente a 1000 rpm por 3 min. Finalmente las células fueron resuspendidas en formaldehído 4 % con PBS.

El mismo procedimiento fue realizado por igual y en forma paralela con el anticuerpo anti-PTK7-APC (MiltenylBiotec Clone:188B).

Las células se analizaron por citometría de flujo (FACS Canto II, BD), utilizando laser de excitación de 633nm y detector BP 660/20nm. Cada ensayo fue realizado por

triplicado y comparado respecto control de células incubadas en ausencia de Sgc8-c-Alexa647, pero tratadas de la misma forma. Se adquirieron 5000 eventos por muestra.

Los datos fueron analizados usando los software FACS Diva (BD) y FlowJo. Para cada línea celular, las células viables a analizar se seleccionaron en base al gráfico de granulocidad/complejidad (*Side Scatter*- SSC) en función del tamaño celular (*Forward Scatter*-FCS) de la suspensión celular, como se muestra en la figura 41.

El Índice de Fluorescencia Relativo total (IFR<sub>T</sub>) fue calculado como la media de la fluorescencia de la población total en presencia del aptámero/la media de la fluorescencia en ausencia del aptámero. De forma similar el Índice de Fluorescencia Relativo específico (IFR<sub>E</sub>) fue calculado como la media de la fluorescencia de la población Sgc8-c-Alexa647 positiva en presencia del aptámero/la media de la fluorescencia del total de la población en ausencia del aptámero.

A partir de estos últimos valores se determinó la  $K_d$  para cada línea celular en base al ajuste realizado mediante el programa GraphPad Prism 6.

#### 4.3.2 Microscopía confocal

Las líneas celulares tumorales A20, B16F1, CCRF-CEM, LS174T y Ramos fueron incubadas con el aptámero Sgc8-c-Alexa647 y observadas por microscopía confocal (LEICATCS-SP5-DMI6000).

Las líneas celulares adherentes B16F1 y LS174T fueron crecidas sobre cubre-objetos. Previo a la incubación con el conjugado los porta-objetos fueron lavados con PBS pH 7,4 para remover el medio de cultivo. El resto de las líneas celulares fueron crecidas en suspensión y el medio de cultivo se retiró por centrifugación a 800 rpm por 5 min. Las células se suspendieron en PBS pH 7,4 y fueron centrifugadas nuevamente.

El estudio se llevó a cabo tras la incubación de una cantidad en exceso del conjugado (0,1 nmol) con aproximadamente 500000 de células a 37 °C a los tiempos 0,5, 1, 2, 4 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación las células se lavaron tres veces con PBS pH 7,4 como se describe anteriormente. Finalmente las células fueron fijadas en PBS/formaldehído al 4 %.

Los preparados fueron realizados usando medio de montaje (ProLong®) y las imágenes fueron tomadas en microscopio confocal LEICATCS-SP5-DMI6000, laser HeNe, 10 mW: 633 nm.

**Tabla 10.** Listado de líneas celulares utilizadas en este trabajo de tesis. Según referencia [157] la línea celular CCRF-CEM sería positiva para PTK7 y la línea celular Ramos sería negativa para PTK7.

	Organismo	Tipo celular	Patología	Cultivo	Medio de cultivo
A20	Murina	Linfocitos B	Linfoma de células B	Suspensión	RPMI, 10 % SFB, L-Glutamina
B16F1	Murina	Melanocitos	Melanoma	Adherente	DMEM, 10 % SFB, L-Glutamina
CCRF-CEM	Humana	Pre-Linfocitos T	Leucemia linfoblástica aguda	Suspensión	RPMI, 10 % SFB, L-Glutamina
LS174T	Humana	Epiteliales	Adenocarcinoma colorectal	Adherente	DMEM, 10 % SFB, L-Glutamina
Ramos	Humana	Linfocitos B	Linfoma de Burkitt's	Suspensión	RPMI, 10 % SFB inactivado, L-Glutamina



### **4.3.3 Unión a células de los radiomarcados**

El ensayo de unión de los radiomarcados a diferentes líneas celulares fue realizado de forma similar al procedimiento realizado en citometría de flujo. Las células con crecimiento adherente (B16F1 y LS174) se retiraron mecánicamente utilizando un rastrillo para células. Tanto las líneas adherentes como las crecidas en suspensión se lavaron dos veces con PBS por centrifugación para retirar el medio de cultivo.

Posteriormente un millón de células fueron incubadas con 100000 cpm del aptámero radiomarcado, en un volumen final de 0,5 mL. La suspensión de células fue incubada a 37 °C por 30 min, 1 h, 2 h y 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación, el medio fue removido por centrifugación y las células fueron resuspendidas y lavadas dos veces con PBS. La actividad retenida en las células fue medida en un contador gamma. Cada ensayo se realizó por triplicado.

### **4.3.4 Inmunoreactividad**

Los estudios de inmunoreactividad se realizaron con el receptor aislado. Una cantidad variable de receptor PTK7, variante transcripta de PTK7-1 humana (Origene, TP700163), fue adsorbida en tubos de poliestireno de alta área superficial, NUNC® (Brand). Para ello, se prepararon diluciones seriadas del receptor en 2 mL de PBS y se incubaron durante 24 horas a 4 °C.

Posteriormente los tubos se lavaron dos veces con PBS y se adicionó a los tubos una cantidad fija de los diferentes conjugados. La incubación se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Los tubos se lavaron dos veces con PBS y midieron en un contador gamma para los radiomarcados y en el equipo de In-Vivo MS FX PRO para Sgc8-c-Alexa647. Una serie de tubos fueron incubados sin receptor para determinar la unión no específica.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El mismo procedimiento se realizó también tras la incubación del receptor con el anticuerpo anti-PTK7-APC.

## **4.4 Estudios *in vivo***

### **4.4.1 Farmacocinética en ratas**

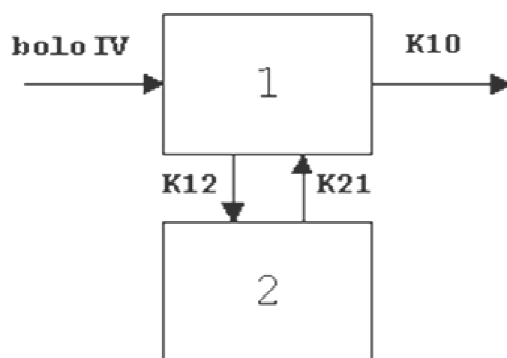
Para realizar los estudios farmacocinéticos una única dosis del radiomarcado, de actividad 150-250 µCi, fue administrada a ratas macho jóvenes Wistar® (200-250 g) por vía intravenosa en bolo (n=3). Las mismas fueron dispuestas en una jaula metabólica para la recolección de orina. Pequeñas muestras de sangre fueron colectadas del globo ocular en tubos capilares a 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 18 y 24 horas post-

inyección. Para ello, las ratas fueron previamente anestesiadas con isofluorano. Pasadas las 24 horas, en donde se realizó la última recolección, se recogió la orina total y todas las muestras fueron pesadas y su actividad fue medida en un contador gamma.

Dicho protocolo fue previamente aprobado por la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

Para el análisis de los resultados el valor de la dosis administrada se corrigió en función del decaimiento correspondiente a cada radionucleido a la hora de medición y los valores normalizados en función del peso de sangre medido.

Finalmente se realizó, mediante el programa WinNonlin, un análisis farmacocinético compartimental y no compartimental (ver Figura 16). Mediante el Akaike (AIC) se eligió el mejor modelo para los datos (comparación de monocompartimental *versus* bicompartimental).



**Figura 16.** Modelo Bi-compartimental seleccionado para el análisis.

#### 4.4.2 Biodistribuciones

Los estudios de biodistribución fueron realizados en ratones BALB-c normales (6 a 8 meses de edad) proporcionados por el DILAVE, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Montevideo-Uruguay.

Aproximadamente 200-2000 kBq de los radiomarcados fueron administrados por vía intravenosa.

Pasado el tiempo de biodistribución de 0,5, 2 h, 4 h y 24 h los grupos de ratones (n=5) fueron sacrificados por dislocación cervical (protocolo aprobado por la CHEA) y finalmente los órganos disectados se pesaron y su actividad fue medida en un

contador de centelleo sólido de pozo (detector de cristal de NaI(Tl) de 3"x3" asociado a un analizador monocanal ORTEC).

#### 4.4.3 Estudios imagenológicos

Los estudios de imagenología molecular *in vivo* fueron realizados tras inyectar una única dosis de los aptámeros en estudio a ratones con tumor inducido. Fueron analizados diferentes modelos tumorales tanto murinos como xenoinjertados con células humanas (ver Tabla 11).

Los modelos tumorales murinos utilizados para imagen se correspondieron a ratones C57BL/6 (DILAVE) inoculados intramuscularmente con células B16F1 (modelo de melanoma murino) y a ratones BALB-c inoculados con inyección subcutánea de células A20 (modelo murino de Linfoma de células B).

En todos los casos la dosis de aptámero (10 y 20 µg de Sgc8-c-Alexa647 y aproximadamente 7,0 MBq de los radiomarcados) fue administrada en bolo por vía intravenosa. La adquisición de las imágenes fue realizada a 2 y 24 horas post-inyección, para Sgc8-c-Alexa647 sólo a las 2 horas post-inyección, en el equipo In-In-Vivo MS FX PRO (Bruker), Centro de investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias-UdelaR, Montevideo-Uruguay, con el ratón anestesiado mediante isofluorano. En el caso del aptámero Sgc8-c-Alexa647 fue necesario sacrificar a los animales (dislocación cervical) y realizar imágenes *ex vivo*.

Asimismo, fue posible realizar una imagen en un ratón SCID inoculado intramuscularmente con células humanas LS174T (modelo xenoimplantado de adenocarcinoma de colon). La adquisición de las imágenes fue realizada en el equipo microSPECT/CT (Siemens Preclinical Solutions) equipado con un colimador pinhole de 2-mm de alta resolución, Harry S. Truman Veteran's Administration Hospital, Columbia, MO-USA.

Dicha imagen fue adquirida a 2 y 24 horas post inyección del aptámero Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc con el ratón anestesiado mediante isofluorano.

**Tabla 11.** Resumen de modelos tumorales utilizados.

Cepa raton	Celulas inyectadas	Modelo	Tipo de cancer
<b>C57BL/6</b>	B16F1	Murino	Melanoma
<b>BALB-c</b>	A20	Murino	Linfoma de células B
<b>SCID</b>	LS174T	Xenoimplantado	Adenocarcinoma de colon

## **5. RESULTADOS**

## 5.1. Modificación de aptámeros

Cuatro aptámeros con la misma secuencia base (Sgc8-c), fueron evaluados en este estudio.

Se partió del aptámero Sgc8-c modificado en su extremo 5' con un extensor de 6 carbonos seguido de un grupo amino libre. Este último permitió realizar las derivatizaciones con NHS-Alexa647, NHS-HYNIC(Iso), NHS-HYNIC(Tfa) y NHS-DOTA para generar agentes de imagen molecular.

Para los productos derivatizados con NHS-HYNIC(Iso), NHS-HYNIC(Tfa) y NHS-DOTA las masas molares fueron determinadas por espectrometría de masas, las mismas se resumen en la Tabla 12. La masa molar del aptámero Sgc8-c sin modificar se correspondería a 12713 Da. Con la incorporación del grupo amino libre junto con el extensor de 6 carbonos, la masa molar del aptámero sería 12813 Da, obteniéndose por parte del fabricante, a partir de la espectrometría de masa (Figura A1, ANEXO), una masa de 12815 y en nuestro estudio una masa de 12813 Da (Figura A1, ANEXO). Tras las modificaciones realizadas, el aptámero Sgc8-c-Alexa647 tendría una masa molar de 13678 Da, el Sgc8-c-HYNIC(Iso) tendría una masa molar de 13005 Da, el Sgc8-c-HYNIC(Tfa) tendría una masa molar de 13045 Da y el Sgc8-c-DOTA tendría una masa molar de 13199 Da.

Tanto el fabricante como nuestros resultados muestran que el conjugado Sgc8-c-HYNIC(Iso) se encuentra en su forma desprotegida a nivel del grupo hidracino, o sea una masa de 12948 Da (Figura A2, ANEXO). Esto puede resultar una desventaja para el trabajo en las etapas posteriores y pudiendo afectar la calidad del conjugado.

Sin embargo, según nuestros resultados, el conjugado Sgc8-c-HYNIC(Tfa) se encuentra en la forma protegida con el agrupamiento trifluoroacetilo (Figura A3, ANEXO).

En el caso del conjugado Sgc8-c-DOTA la espectrometría de masas confirma la reacción de un sólo NHS-DOTA por molécula de aptámero (Figura A4, ANEXO).

Claro está que si bien las modificaciones incorporadas no varían de forma importante la masa molar del aptámero final, las características de dichas moléculas podrían alterar en mayor medida la polaridad de la biomolécula por lo cual las mismas se compararon por RP-HPLC en un gradiente lento. Según el fabricante la variación del número de nucleótidos así como pequeñas variaciones en la molécula podrán distinguirse en este caso.

Tras la obtención del aptámero Sgc8-c derivatizado en sus diferentes formas se procedió a realizar el control de los mismos por RP-HPLC (ver Figuras 17-21). Todos los controles mostraron tiempos de retención característicos (ver Tabla 13).

**Tabla 12.** Secuencia de los aptámeros y resumen de las modificaciones correspondientes (nd = no determinada).

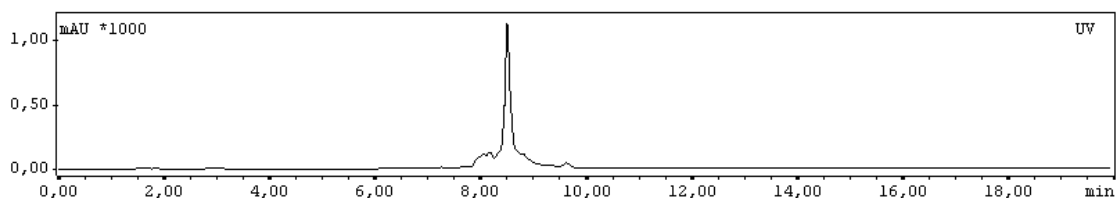
	Secuencia	MM calculada / obtenida	Control
Sgc8-c-NH <sub>2</sub>	5'- /5AmMC6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'	12813 / 12813	Figura 17
Conjugados			
Sgc8-c-Alexa647	5'- /Alexa647/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'	13678 / -nd	Figura 18
Sgc8-c-HYNIC(Iso)	5'- /(Iso)HYNIC/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'	13005 / 12948	Figura 19
Sgc8-c-HYNIC(Tfa)	5'- /(Tfa)HYNIC/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'	13045 / 13045	Figura 20
Sgc8-c-DOTA	5'- /DOTA/C6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT GTA CGG TTA GA -3'	13199 / 13239 (como sal potásica)	Figura 21

El tiempo de retención medido para el aptámero Sgc8-c-NH<sub>2</sub> fue de  $8,52 \pm 0,19$  minutos. Tras la derivatización con HYNIC(Tfa) no se observó variación significativa en el tiempo de retención el cual se correspondió a  $8,19 \pm 0,28$  minutos. Sin embargo, para el aptámero derivatizado con Alexa647 el tiempo se vio retardado levemente siendo de  $7,73 \pm 0,03$  minutos (se observa también un pico menor a  $8,25 \pm 0,02$  minutos). En el cromatograma del Sgc8-c-DOTA fue posible distinguir dos picos superpuestos mayoritarios los cuales mostraron tiempos de retención de  $8,56 \pm 0,08$  y de  $8,64 \pm 0,02$  minutos.

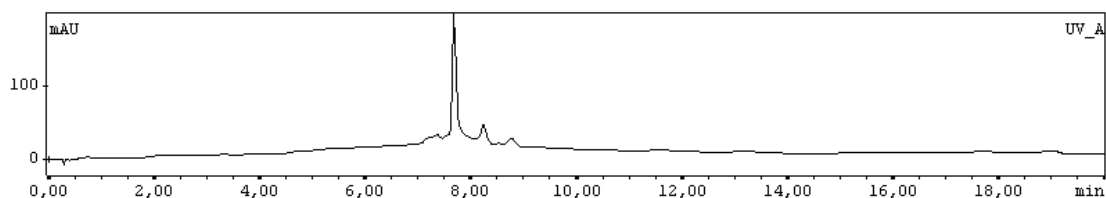
Para el caso de Sgc8-c-HYNIC(Iso) se observaron varios picos correspondientes a los tiempos  $8,18 \pm 0,04$ ;  $8,53 \pm 0,02$ ;  $9,05 \pm 0,03$ ;  $9,22 \pm 0,02$  y  $9,68 \pm 0,07$  minutos.

Debido al tipo de columna utilizada estos controles podrían reflejar cambios en las interacciones débiles establecidas en la interfase debido a la incorporación de modificaciones al aptámero Sgc8-c-NH<sub>2</sub>.

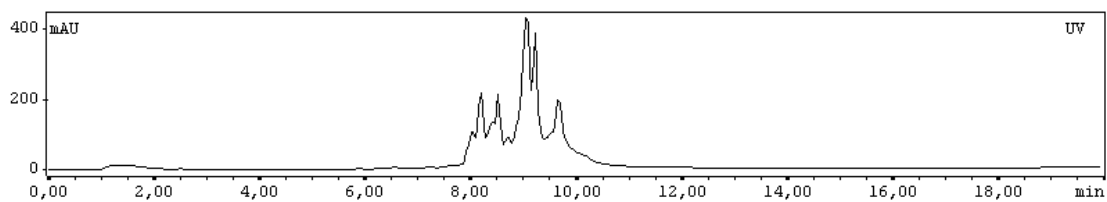
Las impurezas que pudieron estar presentes tras las radiomarcaciones también se controlaron inicialmente siendo el tiempo de retención medido para el pertecneciato de sodio de  $0,70 \pm 0,28$  minutos (Figura 22), para la tricina marcada con <sup>99m</sup>Tc (Figura 23) un tiempo de retención de  $0,75 \pm 0,46$  y para el <sup>67</sup>GaCl<sub>3</sub>  $0,62 \pm 0,10$  minutos (Figura 24).



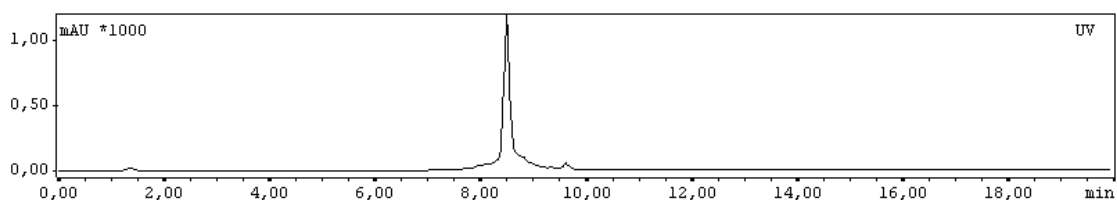
**Figura 17.** Cromatograma de RP-HPLC del aptámero Sgc8-c-NH<sub>2</sub>.



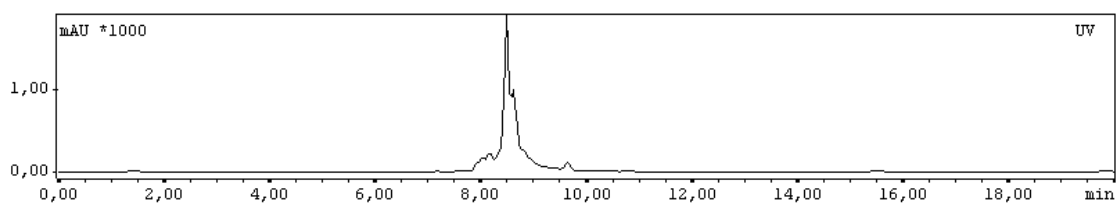
**Figura 18.** Cromatograma de RP-HPLC del aptámero Sgc8-c-Alexa647.



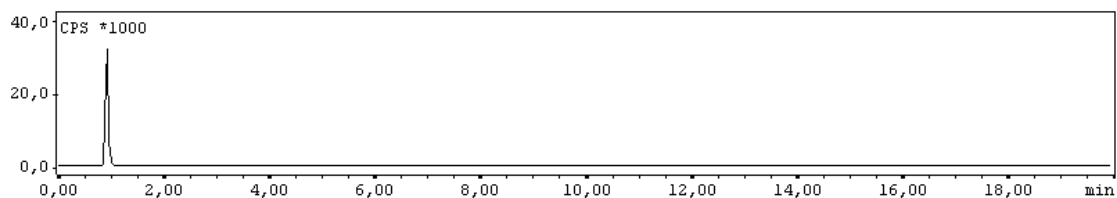
**Figura 19.** Cromatograma de RP-HPLC del aptámero Sgc8-c-HYNIC(Iso).



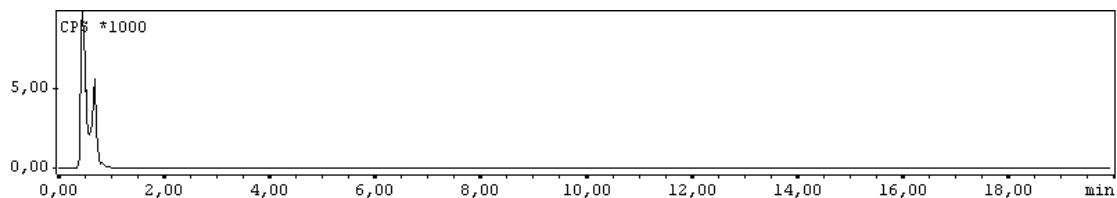
**Figura 20.** Cromatograma de RP-HPLC del aptámero Sgc8-c-HYNIC(Tfa).



**Figura 21.** Cromatograma de RP-HPLC del aptámero Sgc8-c-DOTA.



**Figura 22.** Cromatograma de RP-HPLC del  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ .



**Figura 23.** Cromatograma de RP-HPLC del complejo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tricina.



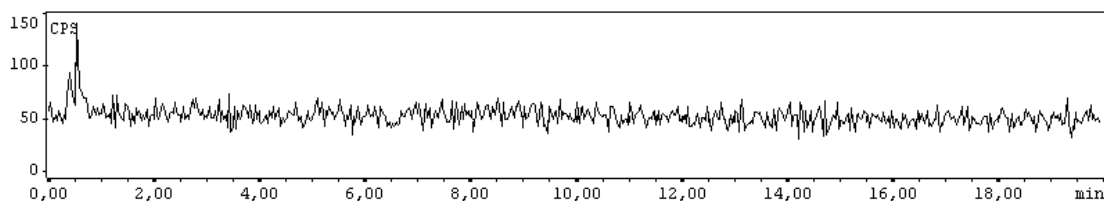


Figura 24. Cromatograma de RP-HPLC del  $^{67}\text{GaCl}_3$ .

## 5.2. Radiomarcación

### 5.2.1 Marcación con Tecnecio-99m

La conjugación del aptámero Sgc8-c HYNIC-(Iso) fue rápida y sencilla. Fue marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a temperatura ambiente obteniéndose una eficiencia máxima de marcación de  $54,0 \pm 1,5 \%$ . Al chequear mediante RP-HPLC en columna C18 se observan tiempos de retención similares mediante UV ( $7,58 \pm 0,16$ ;  $7,92 \pm 0,25$ ;  $8,47 \pm 0,25$ ;  $8,63 \pm 0,23$ ;  $9,07 \pm 0,25$  minutos) (ver Figura 25) y un gran pico único para la detección gamma con tiempos de retención de  $8,15 \pm 0,28$  (ver Figura 25).

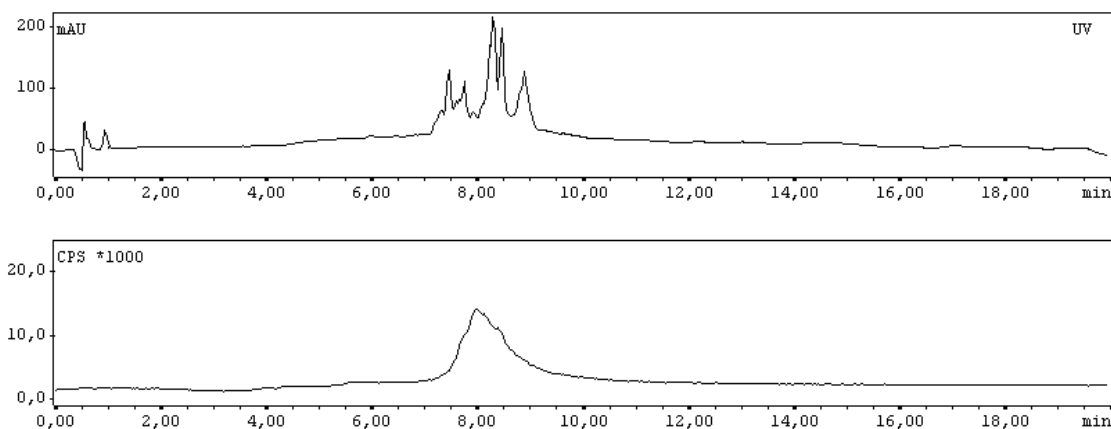
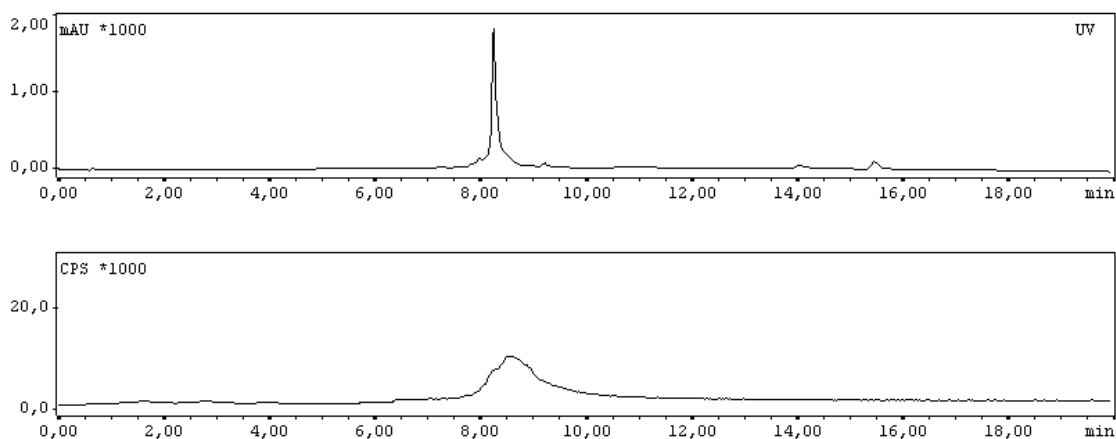


Figura 25. Cromatogramas RP-HPLC en columna C18 del Sgc8-c-HYNIC(Iso)- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  purificado previamente. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.

Sgc8-c-HYNIC(Tfa) fue marcado con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a temperatura ambiente obteniéndose una eficiencia de marcación de  $50,2 \pm 0,3\%$ .

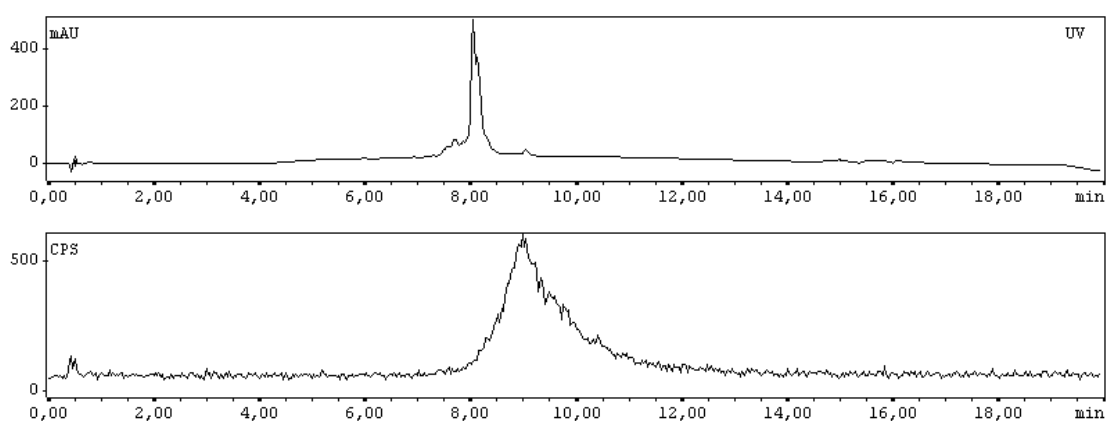
Tras purificar el Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99\text{m}}\text{Tc}$  por C18 fue posible observar una única especie mediante el análisis RP-HPLC (ver Figura 26) con tiempo de retención de  $8,05 \pm 0,03$  y para la detección gamma de  $8,13 \pm 0,28$  minutos.



**Figura 26.** Control por HPLC en columna C18 del Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc purificado previamente. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.

## 5.2.2 Marcación con Galio-67

Luego de un proceso de optimización el aptámero Sgc8-c-NH<sub>2</sub> fue marcado con <sup>67</sup>Ga a 60 °C con rendimientos de marcación superiores al 95 % (ver Figura 27). En este caso, mediante el análisis RP-HPLC, fue posible observar dos picos superpuestos a 8,05 ± 0,05 minutos en detección por UV (ver Figura 27) y para la detección gamma un tiempo de retención de 9,02 ± 0,03 minutos coincidente con un pequeño pico observado por UV al mismo tiempo.



**Figura 27.** Control por RP-HPLC en columna C18 del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga sin purificar. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.

Los tiempos de retención finales analizados por RP-HPLC se resumen a continuación (Tabla 13), observándose corrimientos significativos respecto al aptámero sin derivatizar. Esos corrimientos son aún más importantes cuando se realiza la

marcación siendo en algunos casos diferencias con el aptámero no marcado de más de un minuto.

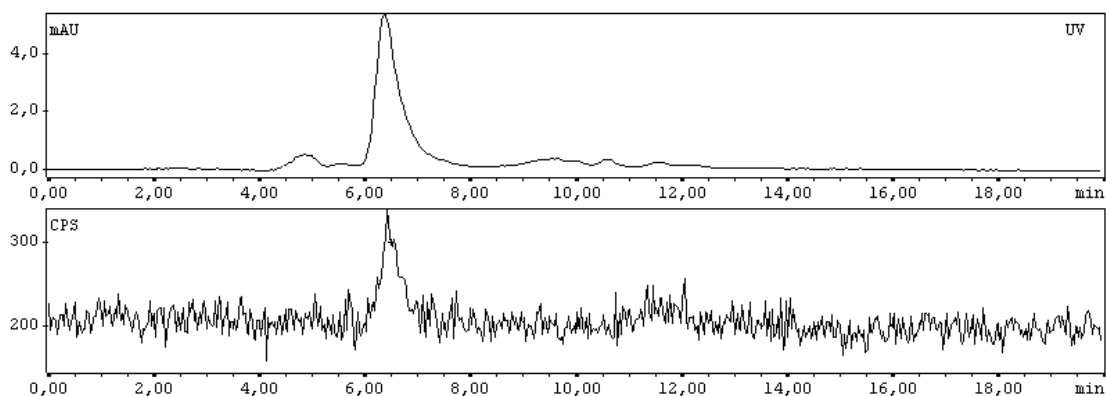
No se encontraron sistemas rápidos de control de pureza radioquímica que resultaran consistentes. Entre los sistemas rápidos analizados no fue posible separar correctamente el aptámero marcado de sus impurezas.

**Tabla 13.** Tiempos de retención en columna C18 de todas las especies en estudio.

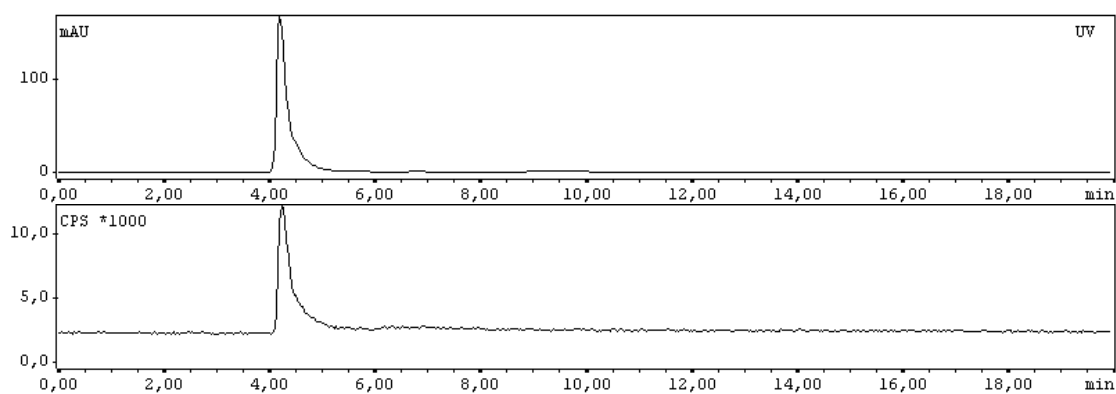
<b>Especie</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
Sgc8c-NH <sub>2</sub>	8,52 ± 0,19
Sgc8c-Alexa647	7,73 ± 0,03; 8,25 ± 0,02
Sgc8-c-HYNIC(Iso)	8,18 ± 0,04; 8,53 ± 0,02; 9,05 ± 0,03; 9,22 ± 0,02; 9,68 ± 0,07
Sgc8-c-HYNIC(Iso)- <sup>99m</sup> Tc	8,15 ± 0,28
Sgc8-c-HYNIC(Tfa)	8,19 ± 0,28
Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- <sup>99m</sup> Tc	8,13 ± 0,28
Sgc8-c-DOTA	8,56 ± 0,08; 8,64 ± 0,02
Sgc8-c-DOTA- <sup>67</sup> Ga	9,02 ± 0,03

### 5.2.3 Purificación

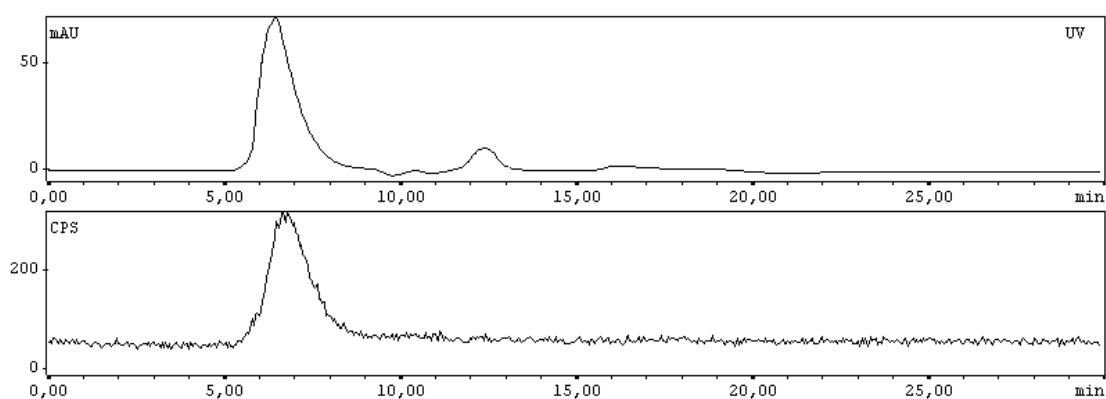
En este estudio se analizaron varios sistemas de purificación. Entre ellos, el sistema de purificación rápido por microcon no fue lo suficientemente efectivo para recuperar un radiomarcado  $\geq 95$  % puro. Sin embargo, la utilización de columna de exclusión molecular (PD10) para purificar grandes cantidades del radiomarcado fue efectiva. Los volúmenes de retención tras la elusión con agua fue de  $4,10 \pm 0,50$  mL para el Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc,  $4,30 \pm 0,61$  mL para el Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc y  $3,82 \pm 0,35$  mL para Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga. A continuación (Figuras 28-30) se muestran los HPLC luego de la purificación por columna de exclusión molecular de los aptámeros radiomarcados puros en disolución de marcación.



**Figura 28.** Control por HPLC en columna de exclusión molecular, Protein Pak 300SW (Waters) en modo isocrático y flujo 1mL/min, con buffer fosfato 0,01 M como fase móvil, del Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc purificado previamente. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



**Figura 29.** Control por HPLC en columna de exclusión molecular del Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc purificado previamente. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



**Figura 30.** Control por HPLC en columna de exclusión molecular del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga sin purificar. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.

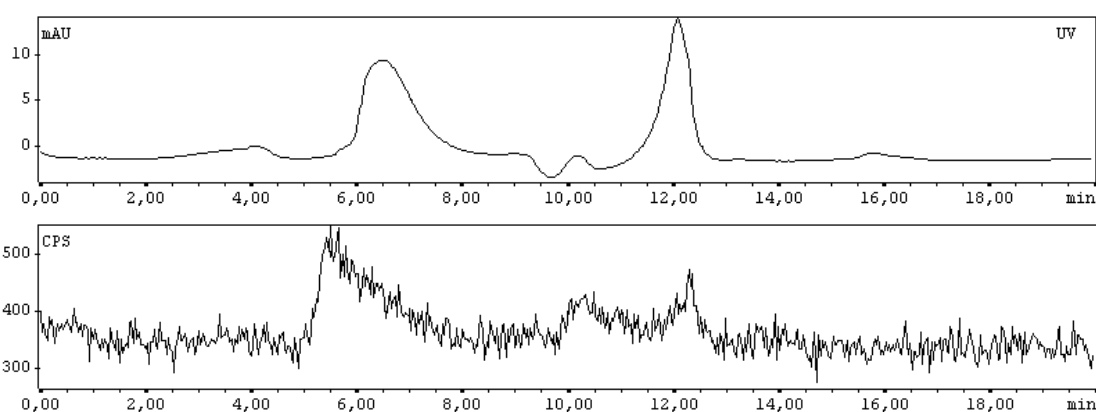
## 5.2.4 Estabilidad de las marcaciones

Para verificar la estabilidad en disolución salina de los radiomarcados se realizó el control por columna de exclusión molecular mediante HPLC.

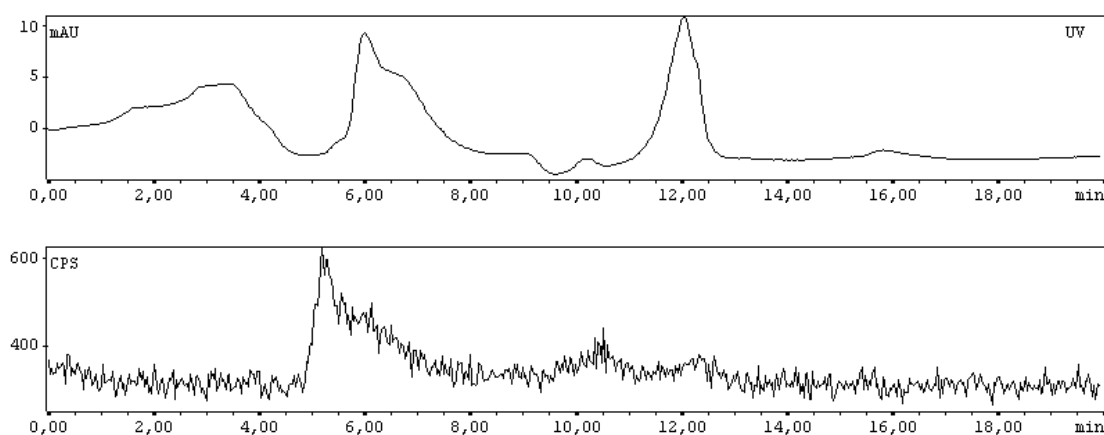
Para todas las especies los estudios de estabilidad en disolución de marcado no mostraron alteraciones siquiera pasadas las 24 horas del marcado. Los cromatogramas para las 24 horas post-incubación son los mostrados anteriormente (Figuras 28-30).

Sin embargo, para los estudios de estabilidad en suero se vieron importantes cambios en los cromatogramas a partir de tiempos de incubación cortos como 2 horas.

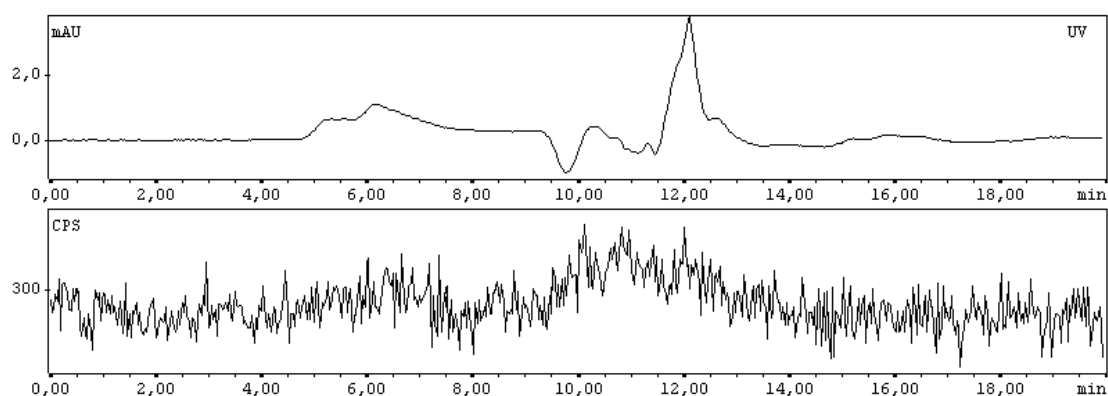
El Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc se mantuvo estable en la disolución de marcado, pero no fue así en suero fetal bovino a 37 °C por un período de 24 h (Figura 31-33).



**Figura 31.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc a las 2 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



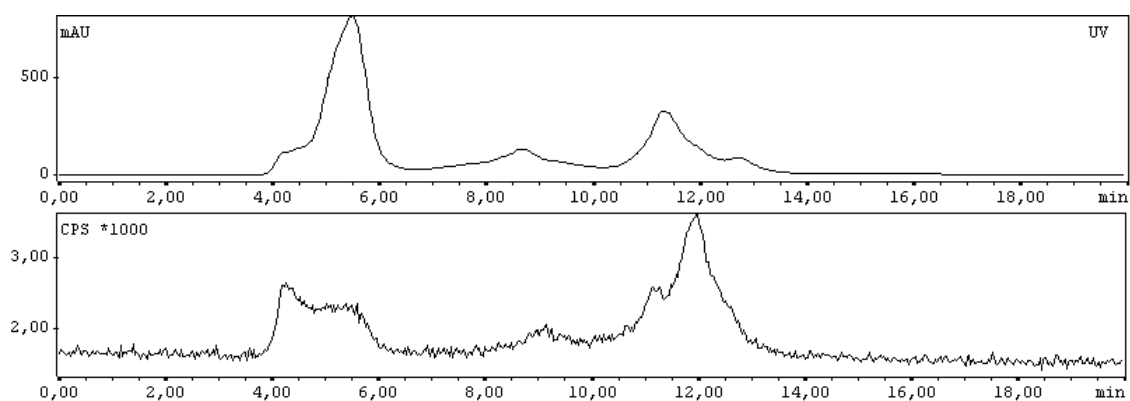
**Figura 32.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc a las 4 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



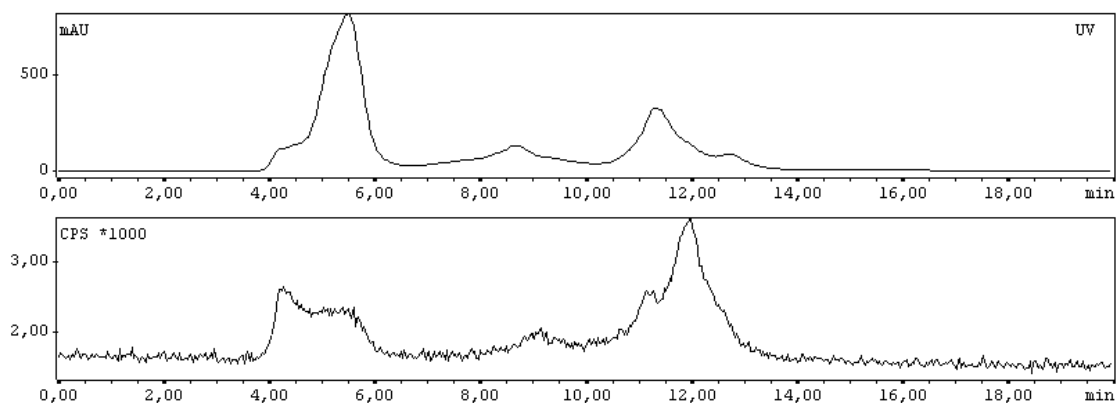
**Figura 33.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-HYNIC(Iso)- $^{99m}\text{Tc}$  a las 24 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.

El Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99m}\text{Tc}$  se mantuvo estable en la disolución de marcado, pero no fue así en suero fetal bovino a 37 °C por un período de 24 h.

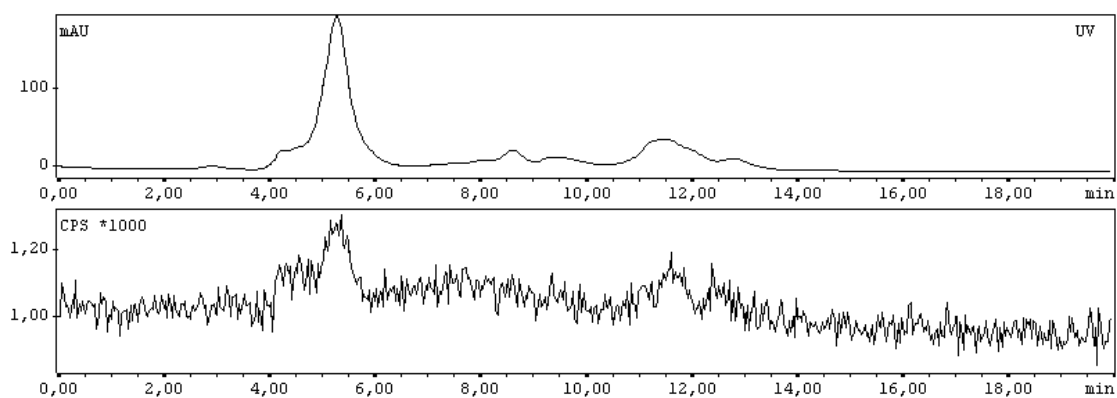
A continuación (Figuras 34-36) se muestran los cromatogramas obtenidos a los diferentes tiempos de incubación en suero fetal bovino. El marcado original se muestra anteriormente para los controles (ver Figura 28-30).



**Figura 34.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99m}\text{Tc}$  a las 2 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



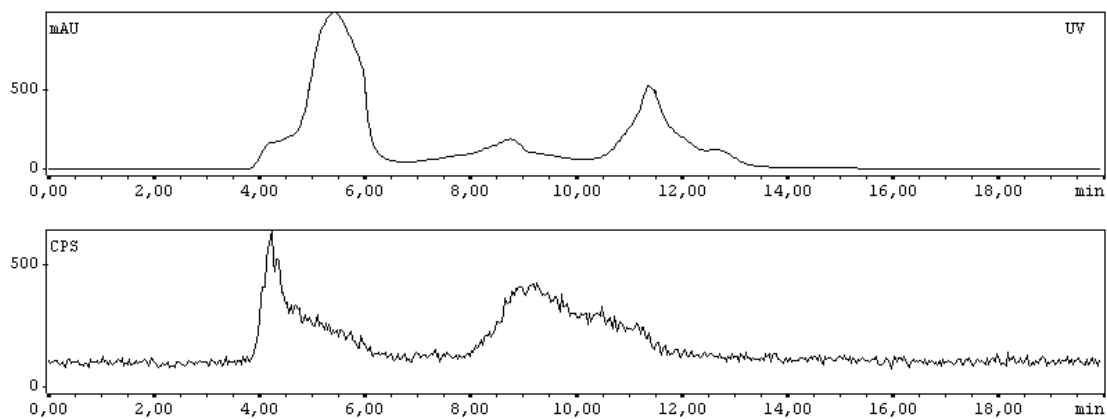
**Figura 35.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc a las 4 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



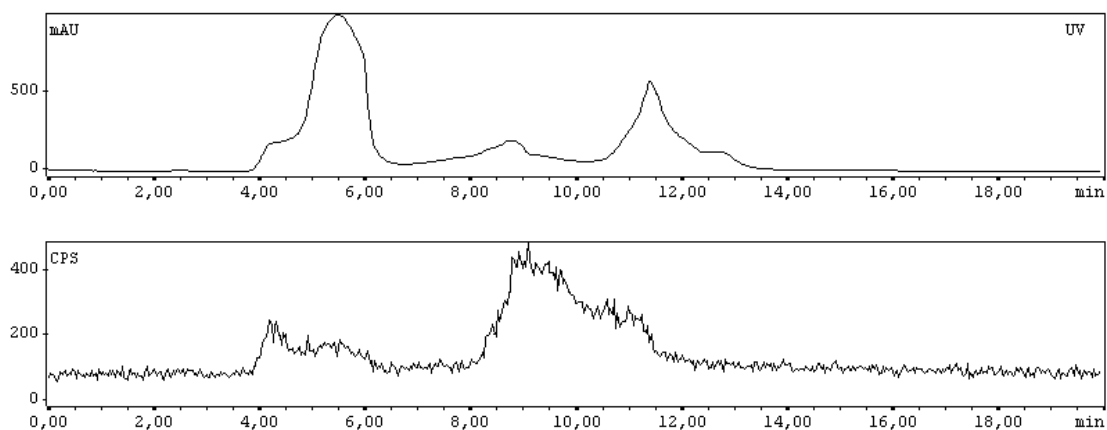
**Figura 36.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc a las 24 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.

El Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga se mantuvo estable en la disolución de marcado, pero no fue así en suero fetal bovino a 37 °C por un período de 24 h.

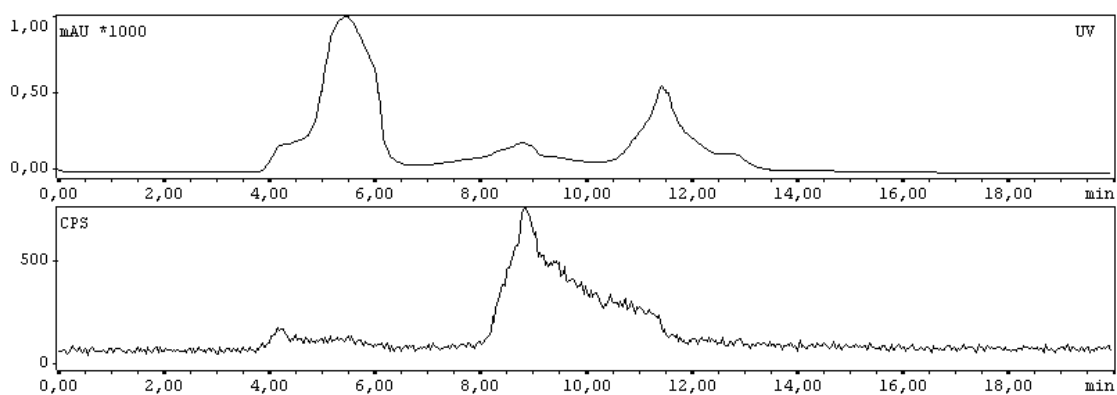
A continuación se muestran (Figura 37-39) los cromatogramas obtenidos a los diferentes tiempos de incubación en suero fetal bovino. El marcado original se muestra anteriormente para los controles (ver Figura 30).



**Figura 37.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga a las 2 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



**Figura 38.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga a las 4 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



**Figura 39.** Estabilidad en suero fetal bovino de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga a las 4 horas post-incubación. En la parte superior se observa el cromatograma por UV y debajo el cromatograma con detector gamma.



### 5.2.5 Coeficiente de reparto

En la Tabla 14 se muestran los coeficientes de reparto calculados a partir de la incubación de los diferentes aptámeros en estudio con una mezcla de *n*-octanol:PBS. Los valores más negativos, entidades más hidrofílicas, correspondieron a los aptámeros que incluyeron el agente bifuncional HYNIC (en donde se utilizó tricina como coligando).

Valores que indican mayor lipofilia fueron obtenidos para los aptámeros que incluyeron Alexa647 y el agente bifuncional DOTA.

Estas diferencias podrían representar importantes variaciones tanto en la afinidad de la biomolécula por su receptor y también en el comportamiento *in vivo* del mismo.

**Tabla 14.** Coeficientes de reparto obtenidos experimentalmente

Conjugado	LogP
Sgc8-c-Alexa647	-1,90 ± 0,30
Sgc8-c-HYNIC(Iso)- <sup>99m</sup> Tc	-2,36 ± 0,29
Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- <sup>99m</sup> Tc	-2,67 ± 0,54
Sgc8-c-DOTA- <sup>67</sup> Ga	-1,87 ± 0,05

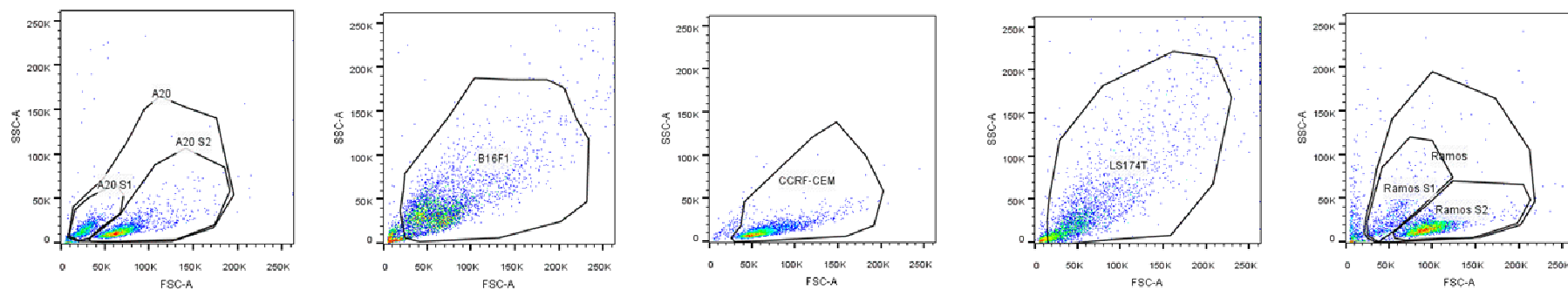
## 5.3 Estudios *in vitro*

### 5.3.1 Citometría de Flujo

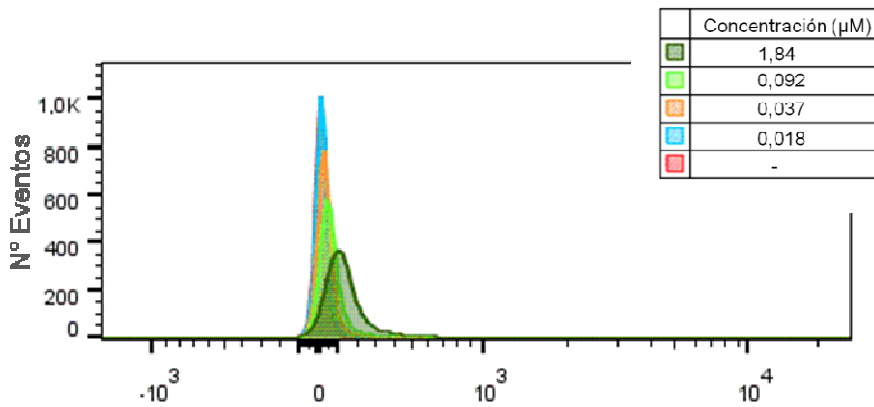
Con el fin de poder la unión específica por las líneas celulares analizadas, se realizaron estudios de unión de Sgc8-c-Alexa647 por citometría de flujo. Para un tiempo fijo de incubación de 30 minutos, las diferentes líneas celulares fueron expuestas a diferentes concentraciones del aptámero.

Inicialmente las poblaciones fueron seleccionadas tal como se muestra en la Figura 40. Tanto en la línea celular A20 como Ramos se evidencian dos poblaciones celulares bien diferenciadas en función del FSC, denominadas Subpoblación 1 (S1, la de menor tamaño celular) y Subpoblación 2 (S2, la de mayor tamaño celular).

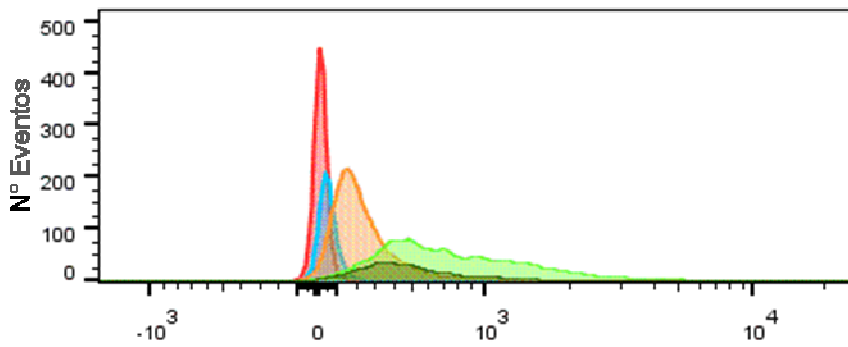
El análisis de la citometría de flujo reflejó comportamientos muy variados entre las diferentes líneas celulares. Sin embargo, para todas las líneas celulares se observa un corrimiento en los histogramas en función del aumento de la concentración del aptámero, lo que indica un incremento en la cantidad de aptámero que se une a su receptor y por ende un aumento en la señal de fluorescencia de las células (ver Figuras 40-45).



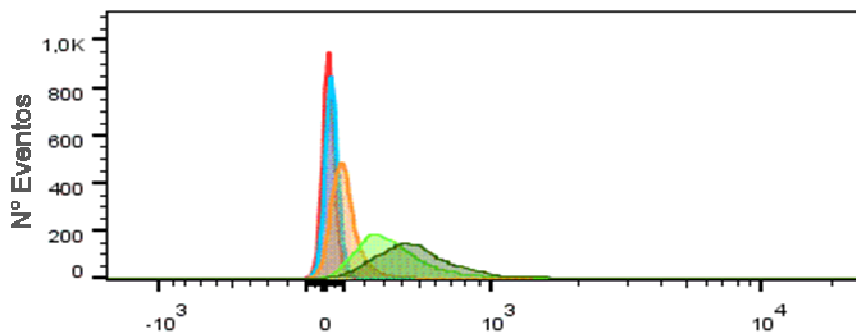
**Figura 40.** FSC vs SSC para las distintas líneas celulares analizadas, donde se observan las poblaciones seleccionadas para el estudio de cada línea celular por citometría de flujo.



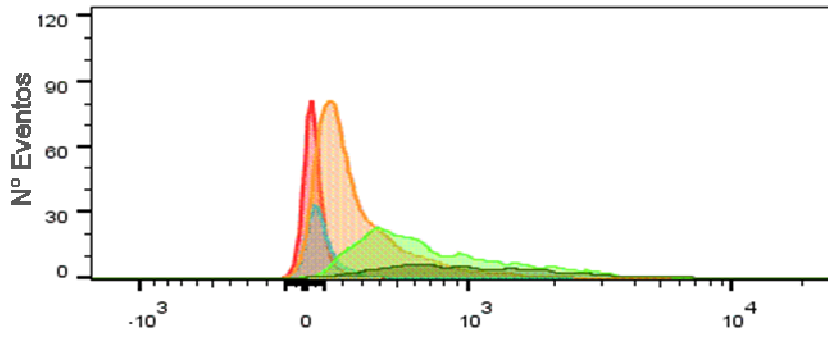
**Figura 41.** Histograma de células A20 para distintas concentraciones de aptámero Sgc8-c-Alexa647.



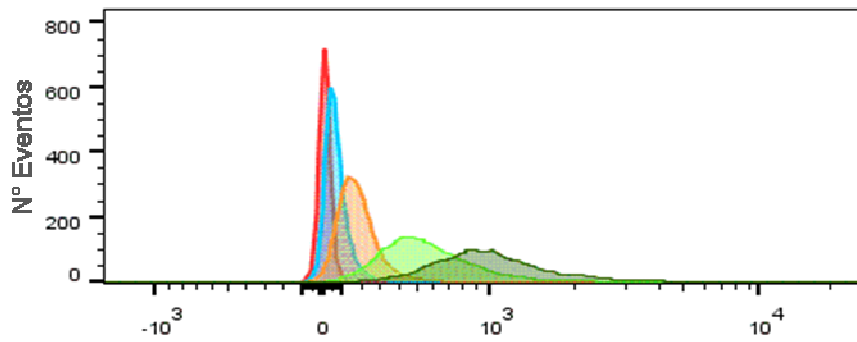
**Figura 42.** Histograma de células B16F1 para distintas concentraciones de aptámero Sgc8-c-Alexa647 (el código de colores es el mismo que para la Figura 41).



**Figura 43.** Histograma de células CCRF-CEM para distintas concentraciones de aptámero Sgc8-c-Alexa647 (el código de colores es el mismo que para la Figura 41)



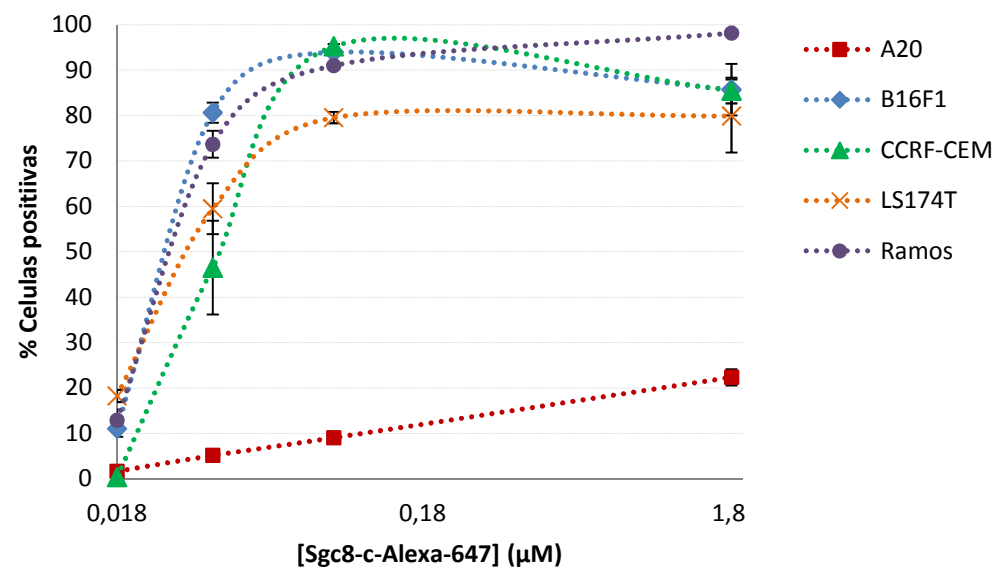
**Figura 44.** Histograma de células LS174T para distintas concentraciones de aptámero Sgc8-c-Alexa647 (el código de colores es el mismo que para la Figura 41).



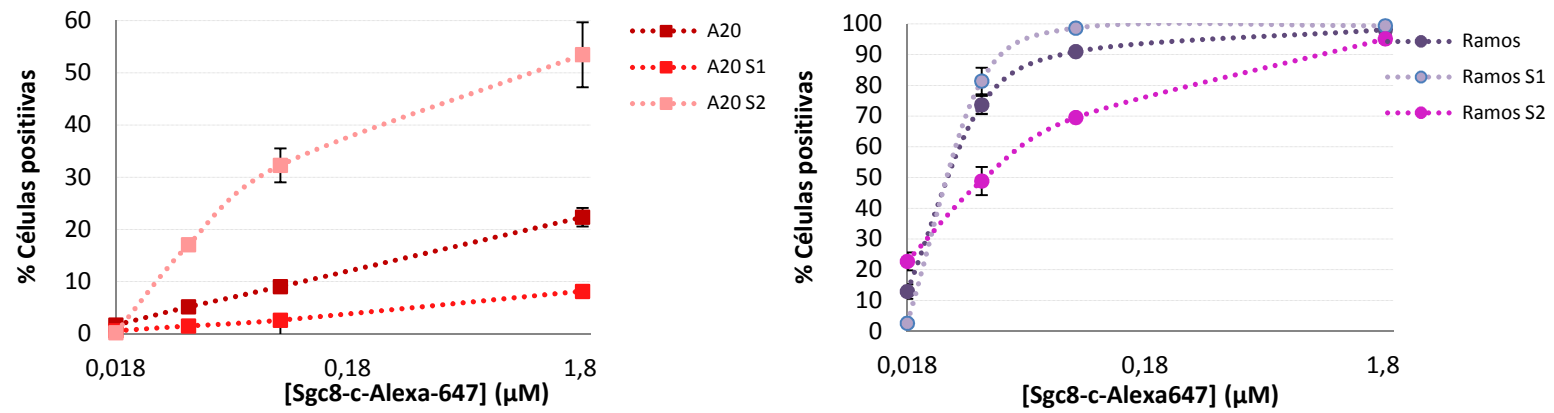
**Figura 45.** Histograma de células Ramos para distintas concentraciones de aptámero Sgc8-c-Alexa647 (el código de colores es el mismo que para la Figura 41).

Asimismo, se realizó un análisis comparativo de todas las líneas celulares. En la Figura 46 se observa el porcentaje de células positivas en función de la concentración del aptámero Sgc8-c-Alexa647. En la mayoría de las líneas celulares se observa una meseta indicando la saturación de los receptores a dicho nivel. Sin embargo, la línea celular A20 no presenta dicha meseta. Si se comparan las dos subpoblaciones derivadas de esta línea celular, cierto nivel de saturación se alcanza en S2 pero no en S1 (ver Figura 47). De forma contraria, se observa que la subpoblación S1 de la línea celular Ramos presenta niveles de saturación a menores cantidades de aptámero que la S2 (ver Figura 47).

Por otro lado, las líneas celulares fueron comparadas con respecto a la intensidad de fluorescencia relativa ( $IFR_T$ ), es decir la cantidad de aptámero unido al receptor por célula en función de la concentración del aptámero. Tres comportamientos bien distintos se observan en el gráfico correspondiente (ver Figura 48). En las líneas celulares B16F1 y CCRF-CEM se observa claramente una meseta, la cual también se alcanza en la línea A20, aunque con distintos niveles de  $IFR_T$  máximo. Las líneas celulares Ramos y LS174T no presentan dicha meseta y aumentan su  $IFR_T$  linealmente con el incremento de la masa de aptámero. Cabe destacar, que las subpoblaciones de las líneas celulares A20 y Ramos presentan el mismo comportamiento que las células parentales (ver Figura 49).

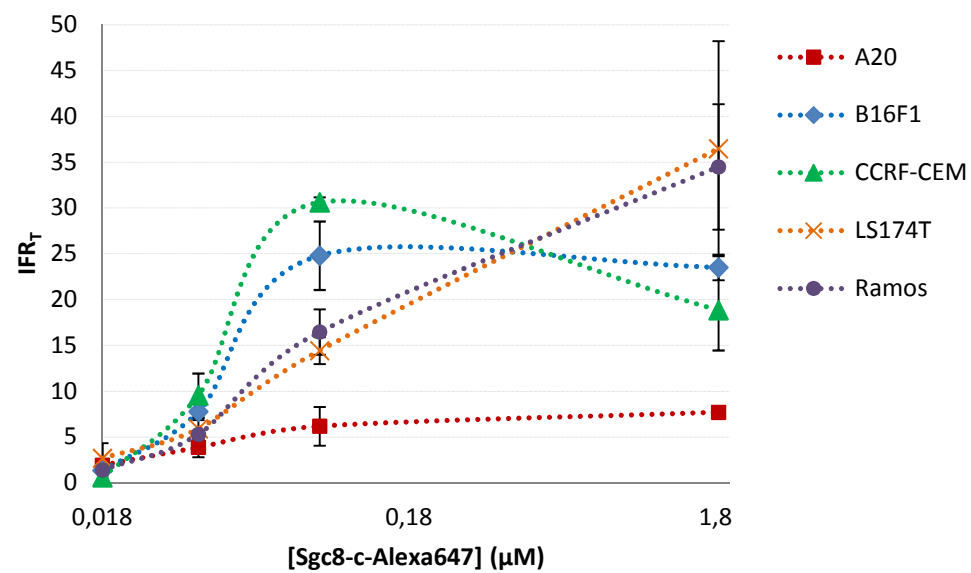


**Figura 46.** Porcentajes de células positivas de las distintas líneas celulares en función de la concentración de Sgc8-c-Alexa647.

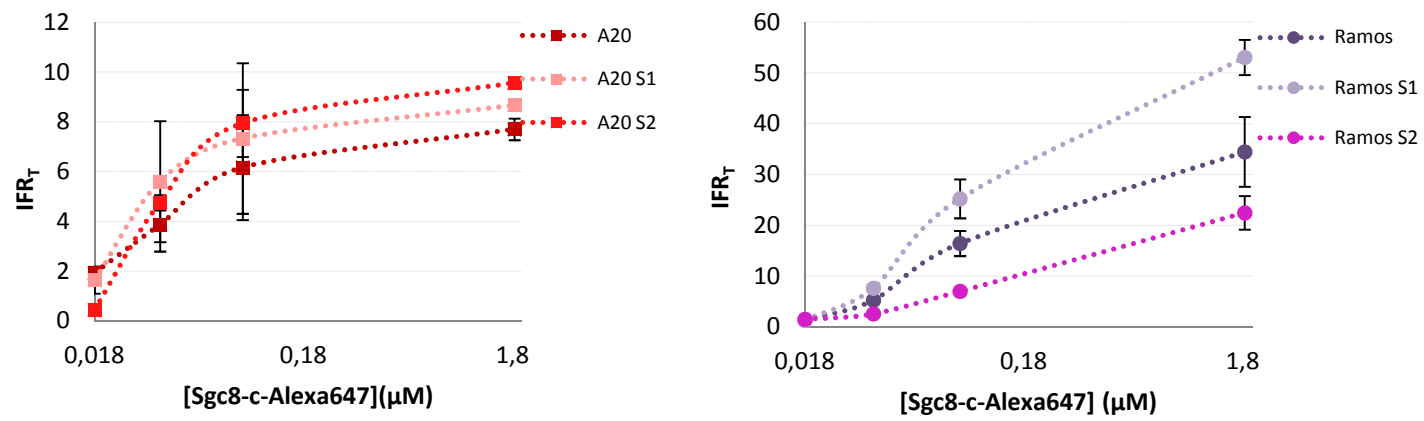


**Figura 47.** Porcentajes de células positivas de las distintas líneas celulares en función de la concentración de Sgc8-c-Alexa647 para las subpoblaciones celulares de las líneas A20 y Ramos.





**Figura 48.** Grafico de IFR<sub>T</sub> en función de la concentración del aptámero Sgc8-c-Alexa647 para todas las líneas celulares.



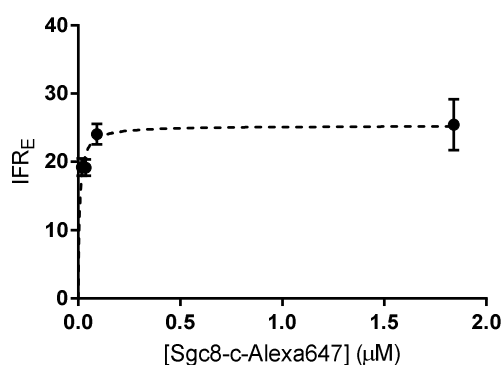
**Figura 49.** IFR<sub>T</sub> en función de la concentración del aptámero Sgc8-c-Alexa647 para las subpoblaciones celulares de las líneas A20 y Ramos.

Posteriormente se realizaron los ajustes no lineales considerando la saturación específica de los receptores celulares. Para ello los IFR de las células fueron calculados para la población positiva (IFR<sub>E</sub>) en función de la concentración del aptámero Sgc8-c-Alexa647 (ver figuras 50-56). A partir de ello se realizó la determinación de la  $K_d$  para cada línea celular y del IFR<sub>E</sub> máximo. En la Tabla 15 se pueden encontrar los valores de  $K_d$  e IFR<sub>E</sub> máximos específicos, resultados del ajuste.

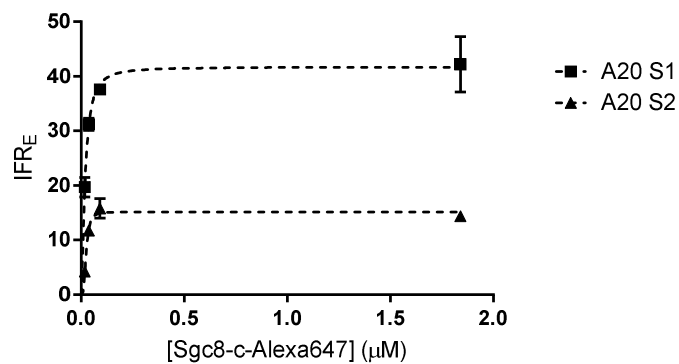
Los valores obtenidos muestran diferencias significativas en la afinidad del Sgc8-c-Alexa647 a cada línea celular y también en la unión máxima observada (IFR<sub>E</sub>).

Como se muestra en la Figura 57, las líneas celulares B16F1, CCRF-CEM y LS174T muestran comportamientos similares si se comparan todos los parámetros analizados. No obstante LS174T posee una  $K_d$  de un orden de magnitud mayor (Tabla 15).

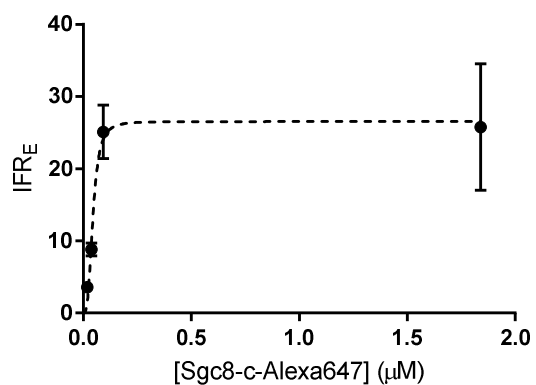
Las subpoblaciones de las líneas celulares A20 y Ramos muestran gran diferencia entre sí con respecto a la IFR<sub>E</sub> máximo (ver Figuras 51 y 56). Sin embargo la línea parental A20 presenta un  $K_d$  dos órdenes de magnitud menor que Ramos (Tabla 15).



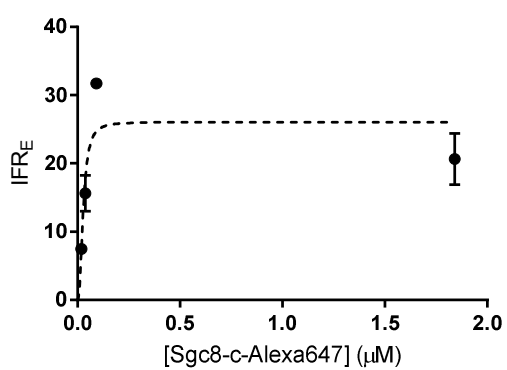
**Figura 50.** Ajuste no lineal para la línea celular A20.



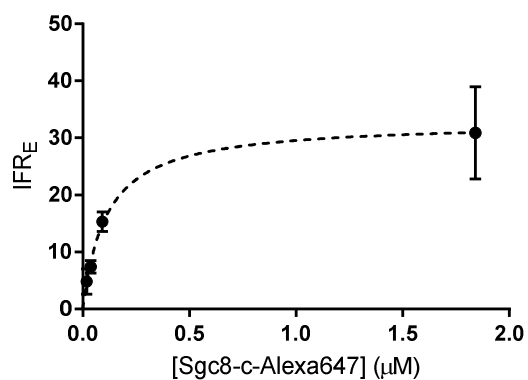
**Figura 51.** Ajuste no lineal para las subpoblaciones S1 y S2 de la línea celular A20.



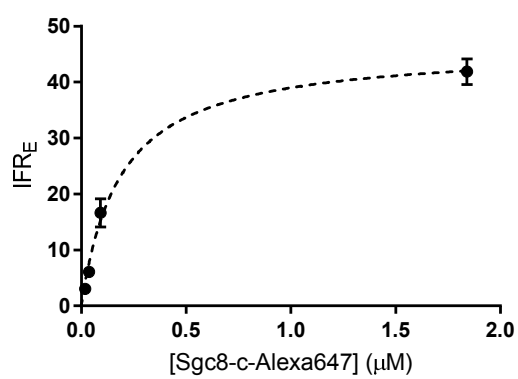
**Figura 52.** Ajuste no lineal para la línea celular B16F1.



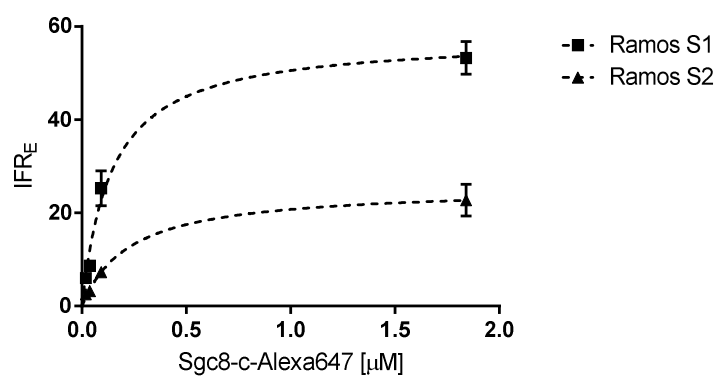
**Figura 53.** Ajuste no lineal para la línea celular CCRF-CEM.



**Figura 54.** Ajuste no lineal para a linha celular LS174T.



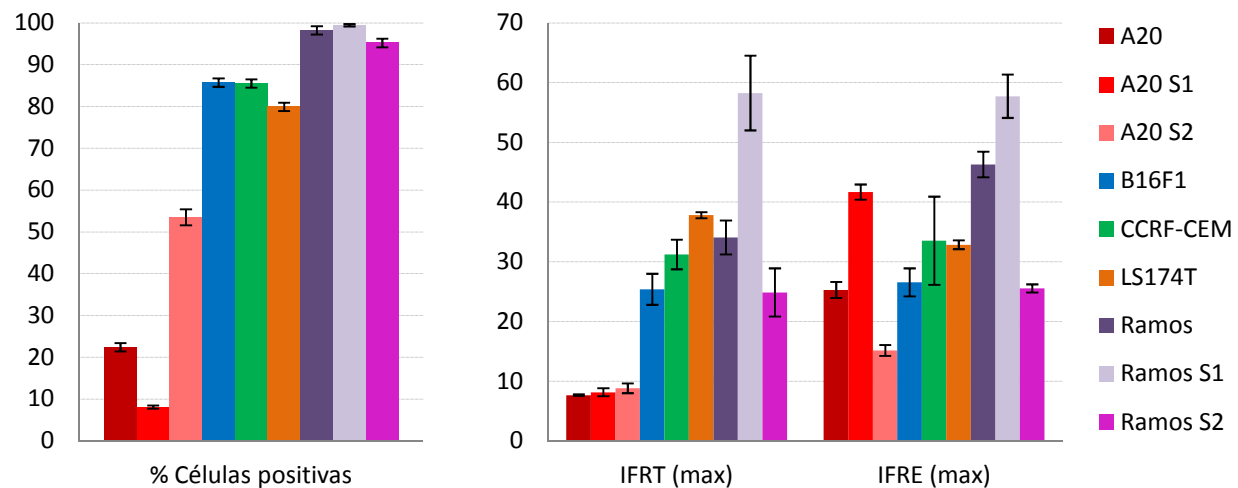
**Figura 55.** Ajuste no lineal para a linha celular Ramos.



**Figura 56.** Ajuste no lineal para a linha celular Ramos, subpopulações S1 y S2.

**Tabla 15.** Resumen de las características observadas para cada línea celular determinado con el aptámero Sgc8-c-Alexa647.

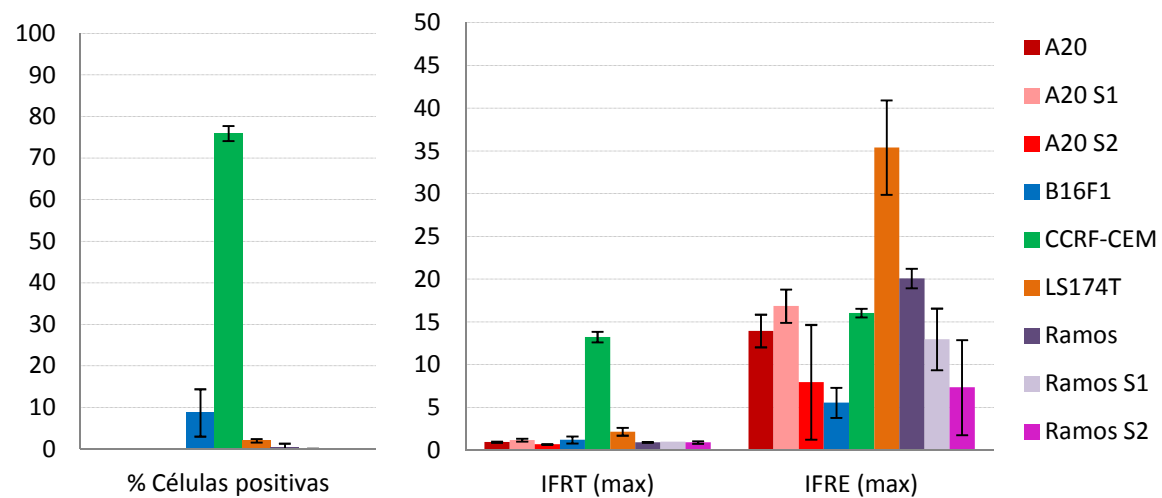
Línea celular	$K_d \pm ds$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IFR}_T$ (max)	$\text{IFR}_E$ (max)
A20	$0,0073 \pm 0,003$	$7,67 \pm 0,12$	$25,29 \pm 1,34$
A20 S1	$0,020 \pm 0,001$	$8,15 \pm 0,66$	$41,66 \pm 1,28$
A20 S2	$0,025 \pm 0,002$	$8,82 \pm 0,82$	$15,15 \pm 0,93$
B16F1	$0,044 \pm 0,007$	$25,39 \pm 2,60$	$26,54 \pm 2,35$
CCRF-CEM	$0,027 \pm 0,006$	$31,21 \pm 2,48$	$33,52 \pm 7,38$
LS174T	$0,11 \pm 0,012$	$37,80 \pm 0,51$	$32,85 \pm 0,74$
Ramos	$0,19 \pm 0,030$	$34,06 \pm 2,84$	$46,29 \pm 2,16$
Ramos S1	$0,14 \pm 0,031$	$58,25 \pm 6,25$	$57,71 \pm 3,62$
Ramos S2	$0,23 \pm 0,021$	$24,87 \pm 4,02$	$25,52 \pm 0,69$



**Figura 57.** Resumen de las características observadas para cada línea celular tras la incubación con el aptámero Sgc8-c-Alexa647. A la derecha se observa el porcentaje de células positivas en relación a la concentración más alta de aptámero utilizada ( $1,87 \mu\text{M}$ ). A la izquierda se muestra el  $\text{IFR}_T$  máximo y  $\text{IFR}_E$  máximo para cada línea celular.

Por otro lado, resultados preliminares obtenidos de un experimento realizado en paralelo con el anticuerpo anti-PTK7-APC, en una concentración de 0,0067  $\mu\text{M}$ , muestran que CCRF-CEM es la única línea celular que exhibe un patrón de unión similar al del aptámero Sgc8-c-Alexa647, con un porcentaje de células positivas comparable (Figura 58). Lo mismo fue observado para los IFR<sub>T</sub>. Sin embargo, cuando se normaliza los resultados respecto a las poblaciones positivas, todas las células mostraron niveles apreciables de IFR<sub>E</sub>, siendo la línea celular LS174T la de mayor IFR<sub>E</sub>.





**Figura 58.** Resumen de las características observadas para cada línea celular tras la incubación con el anticuerpo anti-PTK7-APC. A la derecha se observa el porcentaje de células positivas ( $0,0067 \mu\text{M}$ ). A la izquierda se el  $\text{IFR}_T$  máximo y el  $\text{IFR}_E$  máximo para cada línea celular.

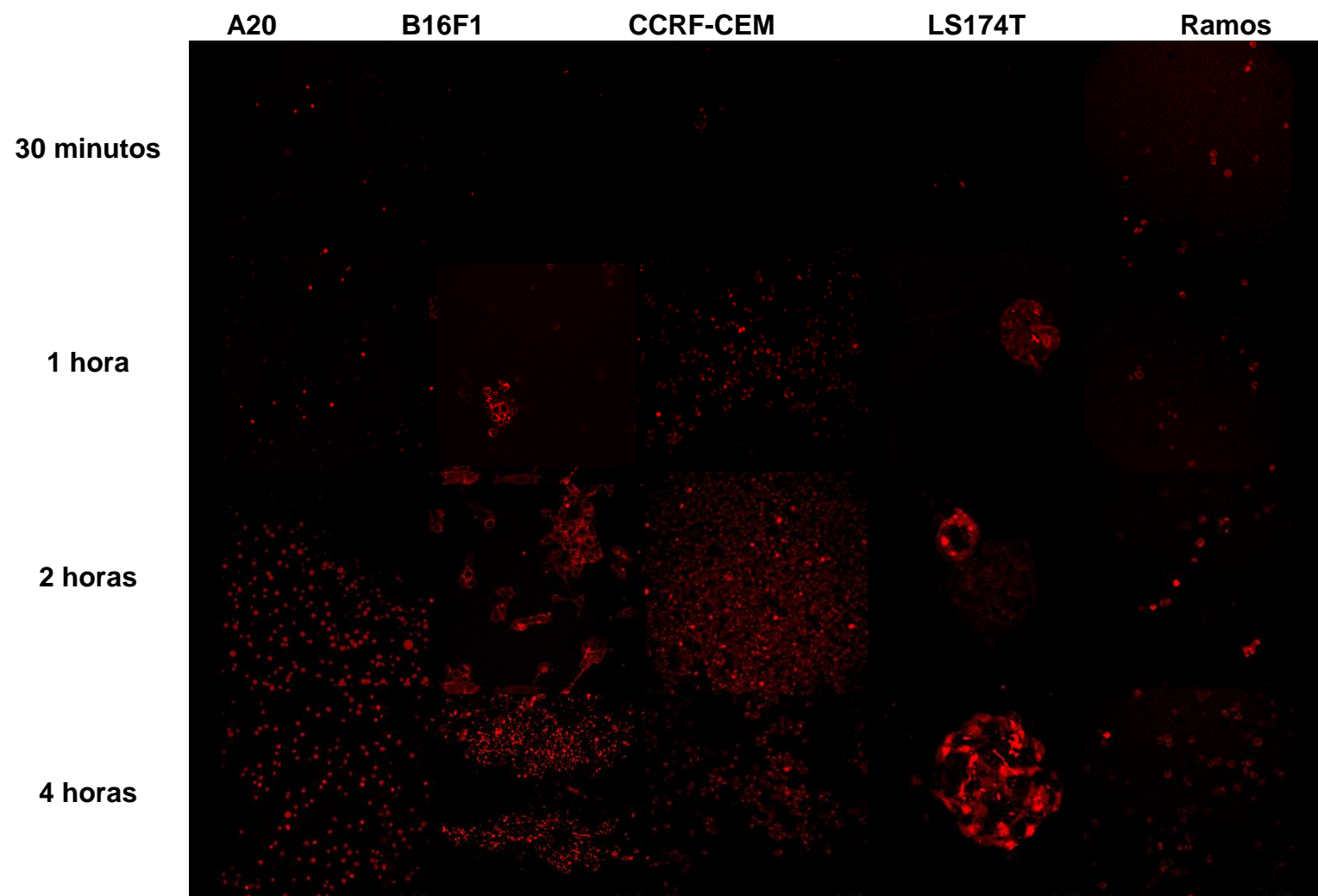
### 5.3.2 Microscopía confocal

Como forma de conocer la dependencia con el tiempo de la interacción del aptámero, marcado fluorescentemente, con las células, se realizó un estudio de microscopía confocal con una dosis fija de Sgc8-c-Alexa647 de 0,037  $\mu$ M.

Los ensayos de microscopía fueron realizados con el fin de visualizar la internalización celular para las diferentes líneas celulares de trabajo. A los 30 minutos de incubación se comienza a ver una señal para todas las líneas celulares. Sin embargo esta señal es débil y aumenta con el tiempo hasta las 4 horas de incubación (ver Figura 59). Teniendo en cuenta las imágenes de luz transmitida se ve la presencia de células no teñidas a los 30 minutos de la incubación, lo cual disminuye en el tiempo para todas las líneas.

Las diferencias de tamaño entre las líneas celulares es muy significativa pero en ellas se logra apreciar pequeños puntos sobre la superficie de la célula en donde la señal es más intensa. Esta disposición no es tan evidente para algunas líneas celulares, sobre todo las más pequeñas (A20, CCRF-CEM y Ramos).

A las 2 horas de incubación ya no se ven variaciones importantes en comparación con las imágenes realizadas 4 horas post-incubación.



**Figura 59.** Imágenes de microscopía confocal, aumento 40X. Se observan las líneas celulares A20, B16F1, CCRF-CEM, LS174T y Ramos. En la parte superior se observan las imágenes a 30 minutos y hacia abajo los tiempos aumentan para 1, 2 y 4 horas de incubación con Sgc8-c-Alexa647.

### 5.3.3 Inmunoreactividad

El ensayo de máxima capacidad de unión para PTK7 fue realizado usando la isoforma PTK7-1 humana (obtenida de células humanas HEK293 por el proveedor). Los ensayos realizados para Sgc8-c-Alexa647, Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc y Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc, no mostraron unión diferenciable de la línea de base del experimento (UNE: unión no específica) y por lo tanto no se muestran en los gráficos. Sin embargo, para el Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga, fue posible realizar la estimación de la  $K_d$  ya que las medidas mostraron cambios respecto a la UNE. A continuación se muestran los cambios en la relación Unido / Total en función de la concentración del receptor PTK7 (Figura 60). El valor de  $K_d$  obtenido según el ajuste realizado por GraphPad Prism6 fue de  $11,37 \pm 0,07 \mu\text{M}$ .

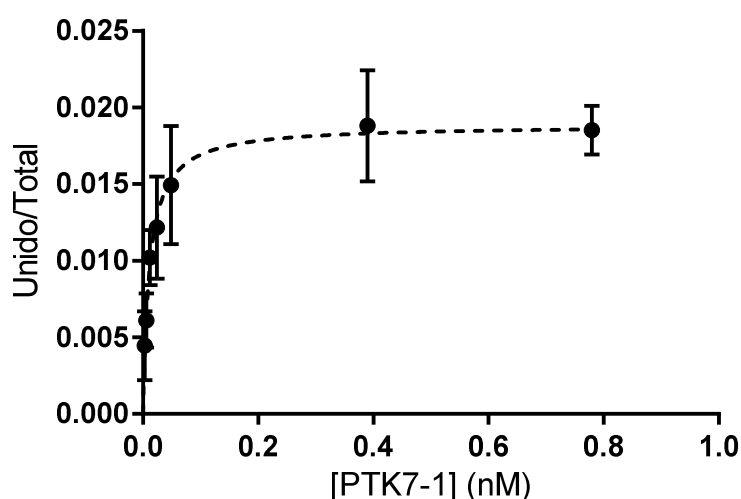


Figura 60. Ajuste de la curva de unión del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga al receptor PTK7-1.

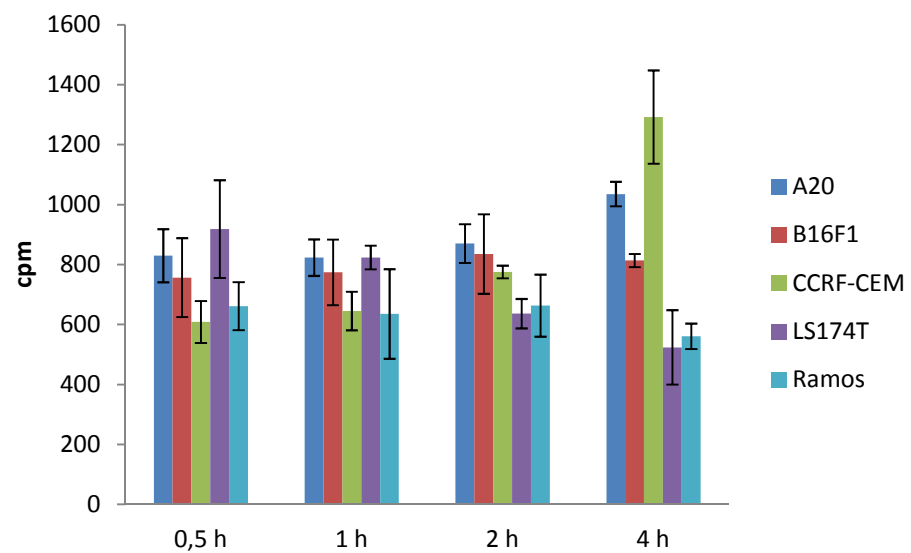
### 5.3.4 Unión celular de los radiomarcados

El estudio de unión de los radiomarcados en diferentes líneas celulares se realizó con el fin de determinar si el aptámero mantiene la afinidad por su receptor. La capacidad de unión del aptámero marcado fue analizada usando las cinco líneas celulares mencionadas anteriormente.

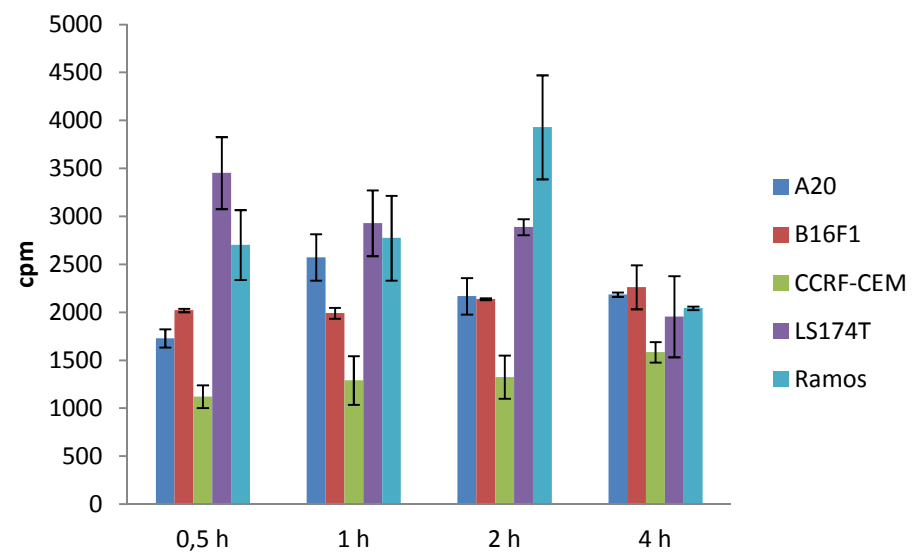
En el estudio de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc no se observa un incremento importante en la unión a lo largo del tiempo ni tampoco niveles diferenciales entre las líneas celulares estudiadas (ver Figura 61). La línea celular que muestra mayor incremento en el tiempo y se diferencia levemente de las otras es la línea celular CCRF-CEM, la cual muestra variación a las 4 horas. En menor medida la línea A20 parece seguir el mismo comportamiento.

Respecto de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc la línea celular Ramos y la LS174T parecen diferenciarse de las otras a tiempos cortos (ver Figura 62). La línea Ramos incrementa su unión hasta las 2 horas y la LS174T muestra una disminución gradual desde las 0,5 horas post-incubación. A las 4 horas no se ven diferencias aparentes.

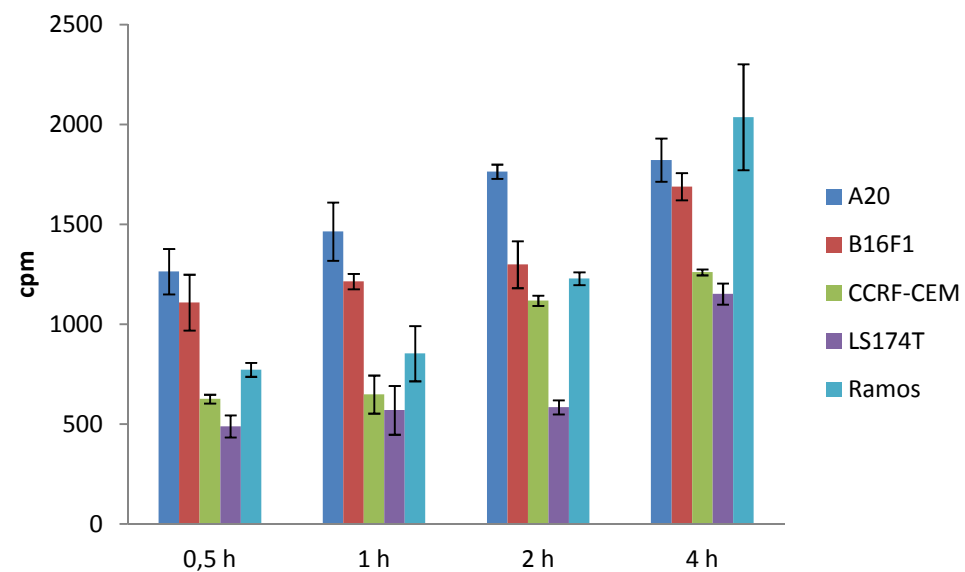
Sin embargo, en el caso del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga todas las líneas celulares estudiadas muestran un incremento en la unión a lo largo del tiempo. Los linfocitos B, tanto A20 como Ramos, son los que resultan en mayores niveles (ver Figura 63).



**Figura 61.** Unión a diferentes líneas celulares. Incubación de un millón de células con aproximadamente 100000 cpm de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc.



**Figura 62.** Unión a diferentes líneas celulares. Incubación de un millón de células con 100000 cpm de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc.



**Figura 63.** Unión a diferentes líneas celulares. Incubación de un millón de células con 100000 cpm de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga.



## 5.4. Estudios *in vivo*

### 5.4.1 Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos realizados para los aptámeros radiomarcados permitieron hallar los parámetros del comportamiento *in vivo* de los mismos (Figuras 64-66). Con este fin, se realizó un análisis no-compartimental inicialmente determinando parámetros tales como  $V_c$  y  $CL_T$ , entre otros. Posteriormente se realizó el ajuste a un modelo bi-compartimental el cual arrojó resultados similares al anterior.

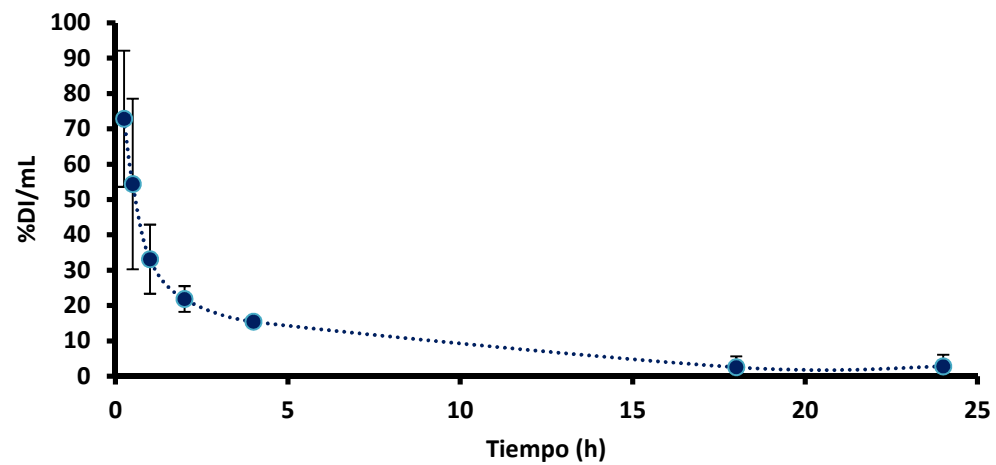
En función de los valores de AIC obtenidos para los modelos analizados (mono-compartimental, bi-compartimental y tri-compartimental) el mejor ajuste se logró para el modelo bi-compartimental.

En todos los casos fue posible observar una fase inicial de depuración sanguínea muy rápida con una fase final muy lenta.

Respecto al ajuste bi-compartimental el  $CL_T$  observado para Sgc8-c-HYNIC(Iso)- $^{99m}Tc$  fue de  $6,06 \pm 0,88 \text{ mLh}^{-1}$  y aproximadamente la tercera parte se correspondió al  $CL_r$   $2,19 \pm 1,19 \text{ mLh}^{-1}$ . El  $CL_r$  es bajo comparado con el  $CL_T$  indicando que la eliminación no es exclusivamente, a esos tiempos, por vía urinaria. El cociente  $K_{12}/K_{21}$  es aproximadamente 4 indicando la acumulación en tejidos periféricos. La  $K_{10}$  es de  $0,46 \pm 0,17 \text{ h}^{-1}$ .

En el caso de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99m}Tc$  el  $CL_T$  fue de  $2,72 \pm 1,31 \text{ mLh}^{-1}$  y el  $CL_r$  de  $2,52 \pm 1,30 \text{ mLh}^{-1}$ , muy similares entre sí. El cociente  $K_{12}/K_{21}$  es aproximadamente 2 y se observa una  $K_{10}$  de  $0,84 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ .

Para el ajuste bi-compartimental de Sgc8-c-DOTA- $^{67}Ga$  el  $CL_T$  fue de  $2,92 \pm 0,74 \text{ mLh}^{-1}$  y el  $CL_r$  de  $0,51 \pm 0,06 \text{ mLh}^{-1}$  (aproximadamente 6 veces menor que el  $CL_T$ ). El cociente  $K_{12}/K_{21}$  es aproximadamente 2 y el valor de  $K_{10}$  fue  $0,23 \pm 0,10 \text{ h}^{-1}$ .



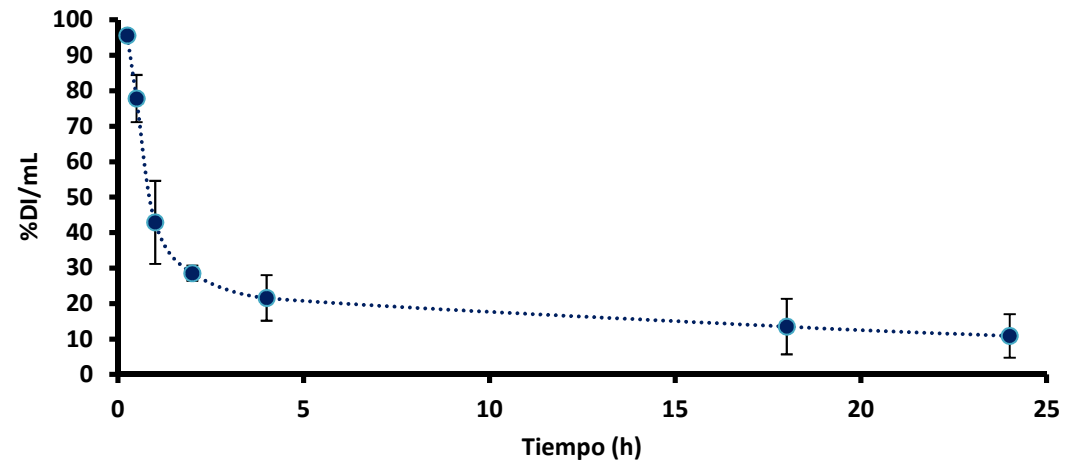
**Figura 64.** Farmacocinética del Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc. Inyección i.v. en bolo. Las muestras fueron colectadas hasta 24 horas post-inyección (no se muestra el ajuste).

**Tabla 16.** Parámetros farmacocinéticos del análisis no-compartimental para la inyección i.v. en bolo del Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc.

Parámetros farmacocinéticos (NCA)	
$t_{1/2}$ (h)	11,55 ± 9,14
AUC(cpmh/mL)	2643291,3 ± 707467,0
$V_c$ (mL)	15,9 ± 2,0
$V_{d_z}$ (mL)	82,31 ± 33,78
$V_{ss}$ (mL)	64,01 ± 15,63
$CL_T$ (mLh <sup>-1</sup> )	6,53 ± 0,56
$CL_r$ (mLh <sup>-1</sup> )	2,53 ± 1,80
$MRT_c$ (h)	5,58 ± 2,50

**Tabla 17.** Parámetros farmacocinéticos del análisis bi-compartimental para la inyección i.v. en bolo del Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc.

Parámetros farmacocinéticos (BCA)	
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,36 ± 0,17
$t_{1/2\beta}$ (h)	6,33 ± 1,61
$K_{12}$ (h <sup>-1</sup> )	2,64 ± 0,14
$K_{21}$ (h <sup>-1</sup> )	0,63 ± 0,24
$K_{10}$ (h <sup>-1</sup> )	0,46 ± 0,17
AUC(cpmh/mL)	2852232,63 ± 739267,14
$C_{max}$ (cpm/mL)	1219480,09 ± 205594,95
$V_c$ (mL)	21,18 ± 1,86
$V_{ss}$ (mL)	89,33 ± 28,96
$CL_T$ (mLh <sup>-1</sup> )	6,06 ± 0,88
$CL_r$ (mLh <sup>-1</sup> )	2,19 ± 1,19
$MRT_c$ (h)	9,60 ± 3,98



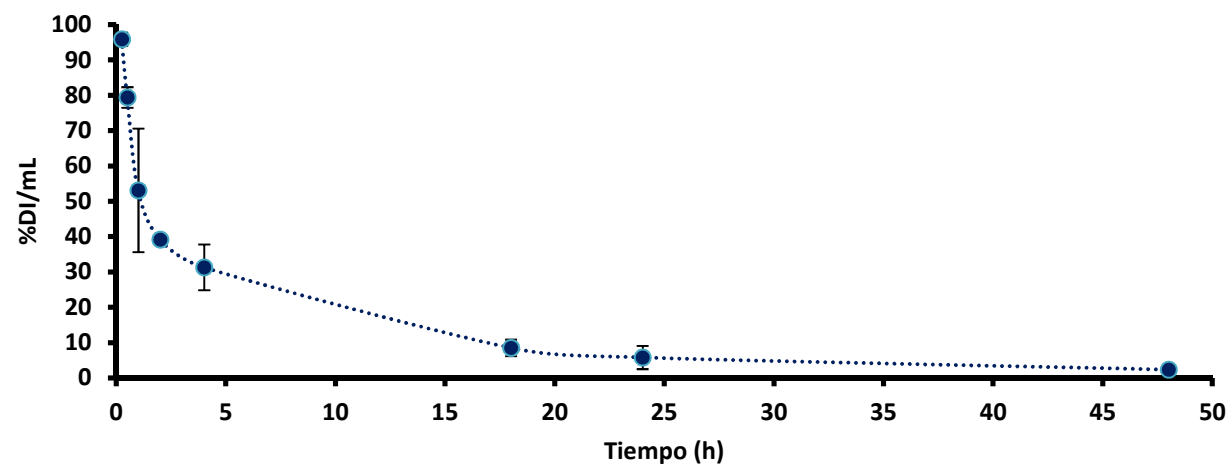
**Figura 65.** Farmacocinética del Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99</sup>Tc. Inyección i.v. en bolo. Las muestras fueron colectadas hasta 24 horas post-inyección (no se muestra el ajuste).

**Tabla 18.** Parámetros farmacocinéticos del análisis no-compartimental para la inyección i.v. en bolo del Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc.

Parámetros farmacocinéticos (NCA)	
$t_{1/2}$ (h)	20,77 ± 9,25
AUC(cpmh/mL)	7557646,33± 1763301,49
$V_c$ (mL)	11,69 ± 3,90
$V_{d_z}$ (mL)	62,56 ± 19,34
$V_{ss}$ (mL)	53,90 ± 14,87
$CL_T$ (mL/h)	3,72 ± 1,33
$CL_r$ (mL/h)	3,43 ± 1,37
MRTc(h)	3,69 ± 2,32

**Tabla 19.** Parámetros farmacocinéticos del análisis bi-compartimental para la inyección i.v. en bolo del Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc.

Parámetros farmacocinéticos (BCA)	
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,50 ± 0,07
$t_{1/2\beta}$ (h)	14,82 ± 5,83
$K_{12}$ (h <sup>-1</sup> )	0,68 ± 0,11
$K_{21}$ (h <sup>-1</sup> )	0,36 ± 0,10
$K_{10}$ (h <sup>-1</sup> )	0,84 ± 0,06
AUC(cpmh/mL)	11353577,58 ± 4956745,18
$C_{max}$ (cpm/mL)	3479916,00 ± 4133109,02
$V_c$ (mL)	10,16 ± 1,30
$V_{ss}$ (mL)	45,23 ± 8,00
$CL_T$ (mLh <sup>-1</sup> )	2,72 ± 1,31
$CL_r$ (mLh <sup>-1</sup> )	2,52 ± 1,30
MRTc(h)	19,44 ± 8,80



**Figura 66.** Farmacocinética del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga. Inyección i.v. en bolo. Las muestras fueron colectadas hasta 48 horas post-inyección (no se muestra el ajuste).

**Tabla 20.** Parámetros farmacocinéticos del análisis no-compartimental para la inyección i.v. en bolo del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga.

Parámetros farmacocinéticos (NCA)	
$t_{1/2}$ (h)	14,98 ± 1,68
AUC(cpmh/mL)	38550017,00 ± 25522768,60
$V_c$ (mL)	15,27 ± 2,03
$Vd_z$ (mL)	40,31 ± 0,87
$V_{ss}$ (mL)	28,28 ± 13,10
$CL_T$ (mLh <sup>-1</sup> )	2,23 ± 0,28
$CL_r$ (mLh <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,05
MRT <sub>c</sub> (h)	6,84 ± 0,19
$K_{10}$ (h <sup>-1</sup> )	0,15 ± 0,00

**Tabla 21.** Parámetros farmacocinéticos del análisis bi-compartimental para la inyección i.v. en bolo del Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga.

Parámetros Farmacocinéticos (BCA)	
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,678 ± 0,23
$t_{1/2\beta}$ (h)	12,32 ± 6,43
$K_{12}$ (h <sup>-1</sup> )	0,59 ± 0,15
$K_{21}$ (h <sup>-1</sup> )	0,32 ± 0,18
$K_{10}$ (h <sup>-1</sup> )	0,23 ± 0,10
AUC(cpmh/mL)	26028187,00 ± 13476824,51
$C_{max}$ (cpm/mL)	4080635,00 ± 1871380,72
$V_c$ (mL)	13,13 ± 2,46
$V_{ss}$ (mL)	42,18 ± 8,68
$CL_T$ (mLh <sup>-1</sup> )	2,92 ± 0,74
$CL_r$ (mLh <sup>-1</sup> )	0,51 ± 0,06
MRT <sub>c</sub> (h)	14,91 ± 7,48

## 5.4.2 Estudios de biodistribución

Los estudios de biodistribución del Sgc8-c radiomarcado fueron realizados en ratones BALB-c normales (6 a 8 meses de edad) a 0,5 h, 2 h, 4 h y 24 h. Los animales fueron mantenidos en el Laboratorio de experimentación animal del Centro de Investigaciones Nucleares, Montevideo, Uruguay. Aproximadamente 200-2000 kBq del aptámero radiomarcado fueron administrados por vía intravenosa. Transcurrido el tiempo de biodistribución los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y finalmente los órganos disectados fueron pesados y su actividad fue medida en un contador de centelleo sólido.

La actividad de los órganos o tejidos se expresa como porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act/g) y como porcentaje de actividad inyectada (%Act).

En relación al Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc fue posible observar un leve remanente en hígado ( $34,88 \pm 9,70$  %Act/g) y bazo ( $15,93 \pm 10,54$  %Act/g) hasta las 4 horas post inyección. Sin embargo, a las 24 horas no se observa captación significativa por estos órganos. El %Act/g en los riñones no superó el 10 % para ninguno de los tiempos siendo de  $8,06 \pm 4,23$  %Act/g a las 24 h. Tanto en sangre, hueso y músculo los %Act/g a todos los tiempos fueron muy bajos (ver Tabla 22, Figura 67).

El %Act para hígado fue de  $36,16 \pm 5,12$  % a las 4 h post inyección y de  $15,82 \pm 3,37$  % a las 24 h. Se observa una tendencia de incremento en intestino encontrándose a las 4 h un  $7,11 \pm 4,70$  %Act. Al cabo de las 2 h la actividad recogida en orina fue de  $42,62 \pm 10,93$  (%Act) y permaneció prácticamente invariable a las 24 h ( $46,79 \pm 13,12$  %Act). No se hallaron %Act significativos en otros órganos (ver Tabla 23, Figura 68).

Sin embargo, diferencias leves fueron apreciadas en la evaluación de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc. Una captación leve fue observada en hígado y bazo a todos los tiempos. La actividad en sangre, músculo y hueso tampoco fue significativa a las 24 horas post inyección. El % de Act/g encontrado en riñones permaneció constante hasta las 4 horas ( $24,42 \pm 7,22$ ) y disminuyó a las 24 horas ( $10,24 \pm 0,58$ ). Para este tiempo el valor encontrado en intestino fue de  $9,00 \pm 2,12$  % Act/g (ver Tabla 24, Figura 69).

Respecto al %Act para el Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc un  $11,26 \pm 2,26$  %Act fue encontrado en sangre a los 30 minutos disminuyendo hasta valores no detectables a las 24 h. La misma tendencia, aunque más lenta se observa en hígado en donde se observa un  $8,93 \pm 2,06$  %Act a los 30 minutos. Para este tiempo un  $6,79 \pm 0,64$  %Act y un  $6,90 \pm 0,56$  %Act fue encontrada en riñones e intestino respectivamente. Al cabo de



24 horas la actividad presente en hígado fue del  $1,85 \pm 0,74$  %, la actividad en riñones fue del  $3,01 \pm 0,81$  %, un  $11,29 \pm 3,47$  % para intestino y el resto prácticamente se encontró en orina. Un  $23,20 \pm 6,86$  %Act fue eliminado en orina pasados 30 minutos post-inyección. Esta tendencia permaneció creciente siendo  $71,40 \pm 4,02$  %Act eliminado por orina (ver Tabla 25, Figura 70).

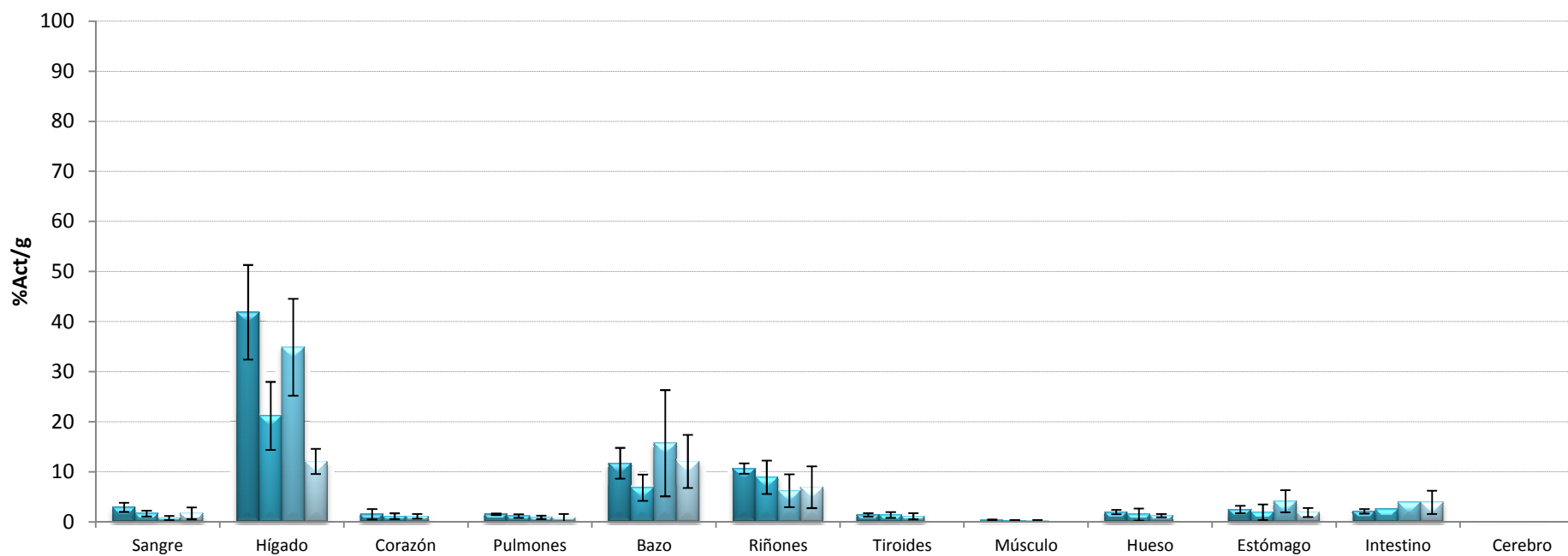
Finalmente el Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga también fue evaluado mediante biodistribución a los mismos tiempos.

Los valores en sangre fueron de  $12,99 \pm 0,94$  %Act/g a los 30 minutos disminuyendo al cabo de las 24 horas a  $3,55 \pm 1,79$  %Act/g. Un  $12,38 \pm 1,75$  %Act/g es el valor encontrado para hígado a los 30 minutos el cual se mantiene prácticamente invariable hasta las 24 horas donde el valor encontrado es de  $13,19 \pm 3,10$  %Act/g. La misma tendencia se da en pulmones. En riñones el %Act/g tiende a crecer encontrándose un valor de  $8,65 \pm 1,38$  %Act/g a las 24 horas. De la misma forma se observa un nivel de  $9,97 \pm 1,41$  %Act/g en intestino a las 24 horas post inyección. El valor en hueso parece aumentar también llegando a valores de  $10,84 \pm 1,55$ % a las 24 horas (ver Tabla 26, Figura 71).

El %Act presente en sangre a los 30 minutos post inyección fueron de  $28,47 \pm 8,44$  % disminuyendo a un nivel de  $4,94 \pm 2,11$  % a las 24 horas. En hígado los niveles permanecen constantes siendo de  $13,43 \pm 2,04$  % a las 24 horas post inyección. La tendencia en intestino es al aumento en donde se encuentra un valor de  $13,41 \pm 1,24$  % a las 24 horas. El nivel de actividad en hueso aumenta hasta valores de  $25,08 \pm 4,96$  % a las 24 horas también. Al cabo de las 24 h la actividad en orina se incrementó llegando a valores de  $31,23 \pm 1,90$  % (ver Tabla 27, Figura 72).

**Tabla 22.** Biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). Datos expresados como %Act/g.

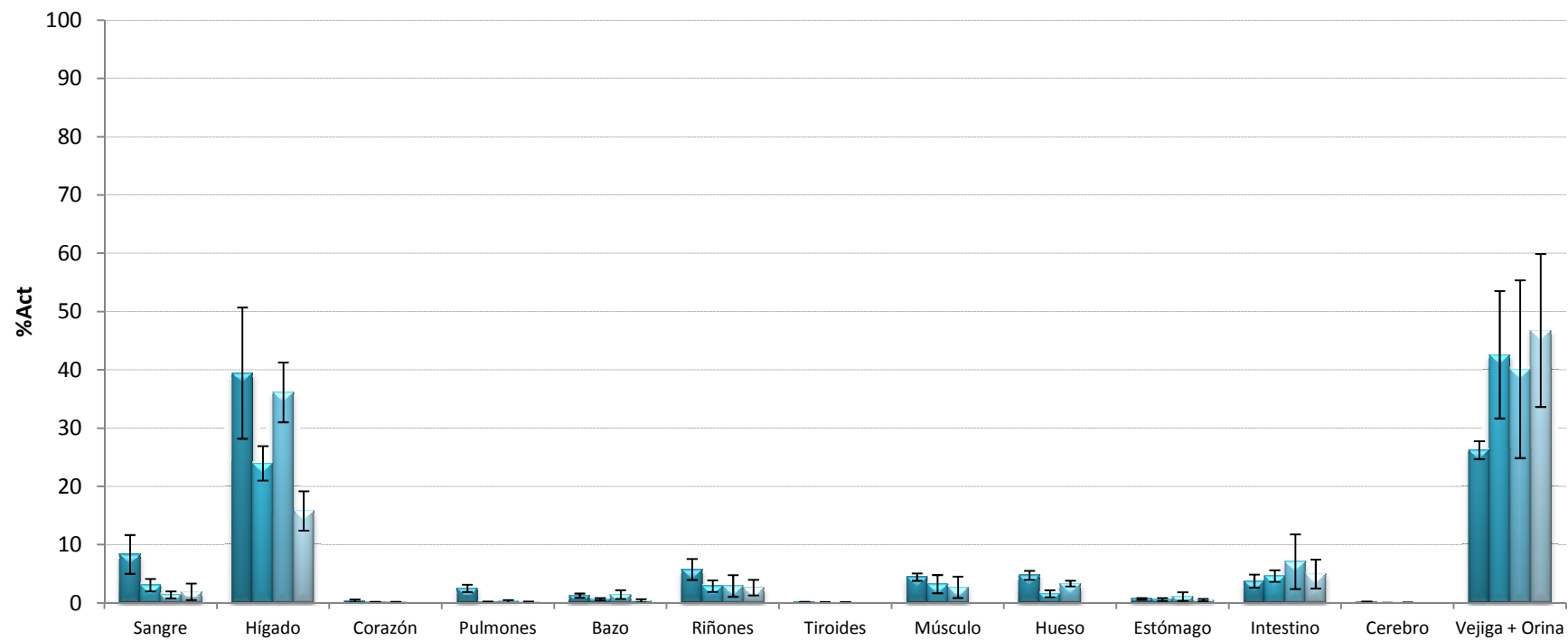
Tejido	Tiempo			
	30 min	2 h	4h	24 h
	Porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act/g $\pm$ ds)			
Sangre	2,97 $\pm$ 0,92	1,71 $\pm$ 0,58	0,91 $\pm$ 0,39	2,84 $\pm$ 1,60
Hígado	41,91 $\pm$ 9,44	21,22 $\pm$ 6,79	34,88 $\pm$ 9,70	1,53 $\pm$ 1,12
Corazón	1,58 $\pm$ 1,04	1,20 $\pm$ 0,57	1,29 $\pm$ 0,45	2,29 $\pm$ 2,07
Pulmones	1,59 $\pm$ 0,14	1,24 $\pm$ 0,36	1,08 $\pm$ 0,49	4,13 $\pm$ 2,54
Bazo	11,76 $\pm$ 3,07	6,89 $\pm$ 2,63	15,93 $\pm$ 10,54	8,80 $\pm$ 5,99
Riñones	1,72 $\pm$ 1,04	8,98 $\pm$ 3,34	6,33 $\pm$ 3,26	8,06 $\pm$ 4,23
Tiroides	1,45 $\pm$ 0,35	1,45 $\pm$ 0,58	1,39 $\pm$ 0,24	3,76 $\pm$ 2,04
Músculo	0,36 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,17	0,28 $\pm$ 0,19	0,98 $\pm$ 0,76
Hueso	2,01 $\pm$ 0,43	1,54 $\pm$ 1,20	1,50 $\pm$ 0,26	2,68 $\pm$ 1,82
Estómago	2,53 $\pm$ 0,75	1,99 $\pm$ 1,55	4,25 $\pm$ 2,28	3,35 $\pm$ 1,66
Intestino	2,17 $\pm$ 0,44	2,59 $\pm$ 0,64	3,97 $\pm$ 2,34	4,00 $\pm$ 2,30
Cerebro	0,09 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,09	0,15 $\pm$ 0,03	1,36 $\pm$ 0,79



**Figura 67.** Gráfico de biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). Datos expresados como %Act/g.

**Tabla 23.** Biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). nd corresponde a medidas no detectables. Datos expresados como %Act.

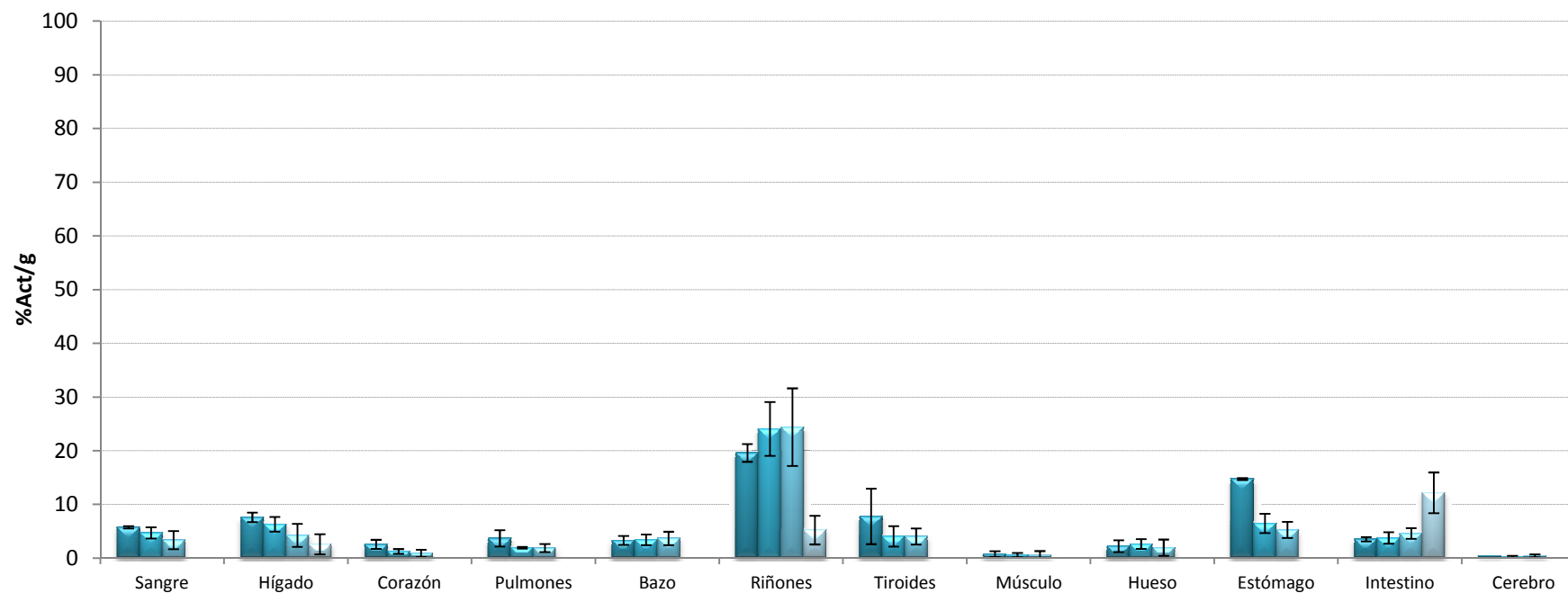
Tejido	Tiempo			
	30 min	2 h	4h	24 h
	Porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act ± ds)			
Sangre	8,35 ± 3,32	3,09 ± 1,07	1,41 ± 0,59	1,93 ± 1,42
Hígado	39,47 ± 11,26	23,99 ± 2,95	36,16 ± 5,12	15,82 ± 3,37
Corazón	0,37 ± 0,26	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,06	nd
Pulmones	2,52 ± 0,64	0,21 ± 0,06	0,28 ± 0,26	0,14 ± 0,12
Bazo	1,28 ± 0,35	0,68 ± 0,20	1,47 ± 0,76	0,40 ± 0,26
Riñones	5,77 ± 1,80	2,92 ± 0,99	2,94 ± 1,85	2,65 ± 1,35
Tiroides	0,19 ± 0,03	0,12 ± 0,05	0,12 ± 0,07	nd
Músculo	4,47 ± 0,63	3,25 ± 1,56	2,71 ± 1,84	nd
Hueso	4,77 ± 0,77	1,62 ± 0,61	3,35 ± 0,51	nd
Estómago	0,73 ± 0,15	0,62 ± 0,25	1,12 ± 0,76	0,51 ± 0,19
Intestino	3,77 ± 1,13	4,66 ± 0,99	7,11 ± 4,70	5,00 ± 2,48
Cerebro	0,17 ± 0,11	0,04 ± 0,03	0,07 ± 0,04	nd
Vejiga + Orina	26,25 ± 1,54	42,62 ± 10,93	40,14 ± 15,25	46,79 ± 13,12



**Figura 68.** Gráfico de biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). Datos expresados como %Act.

**Tabla 24.** Biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). nd corresponde a medidas no detectables. Datos expresados como %Act/g.

Tejido	Tiempo			
	30 min	2 h	4 h	24 h
	Porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act/g ± ds)			
Sangre	5,76 ± 0,23	4,72 ± 1,05	3,36 ± 1,68	nd
Hígado	7,61 ± 0,87	6,33 ± 1,37	4,26 ± 2,14	2,82 ± 1,65
Corazón	2,58 ± 0,85	1,27 ± 0,45	0,92 ± 0,67	nd
Pulmones	3,70 ± 1,53	1,96 ± 0,16	1,90 ± 0,74	nd
Bazo	3,32 ± 0,83	3,43 ± 0,99	3,68 ± 1,25	nd
Riñones	19,61 ± 1,65	24,07 ± 5,02	24,42 ± 7,22	10,24 ± 0,58
Tiroides	7,79 ± 5,16	4,07 ± 1,91	4,04 ± 1,51	nd
Músculo	0,77 ± 0,54	0,59 ± 0,40	0,52 ± 0,82	nd
Hueso	2,27 ± 1,10	2,64 ± 0,92	1,97 ± 1,52	3,31 ± 1,14
Estómago	14,73 ± 0,17	6,48 ± 1,79	5,27 ± 1,51	1,60 ± 0,57
Intestino	3,55 ± 0,40	3,78 ± 1,08	4,61 ± 0,98	9,00 ± 2,12
Cerebro	0,50 ± 0,13	0,28 ± 0,19	0,44 ± 0,28	nd

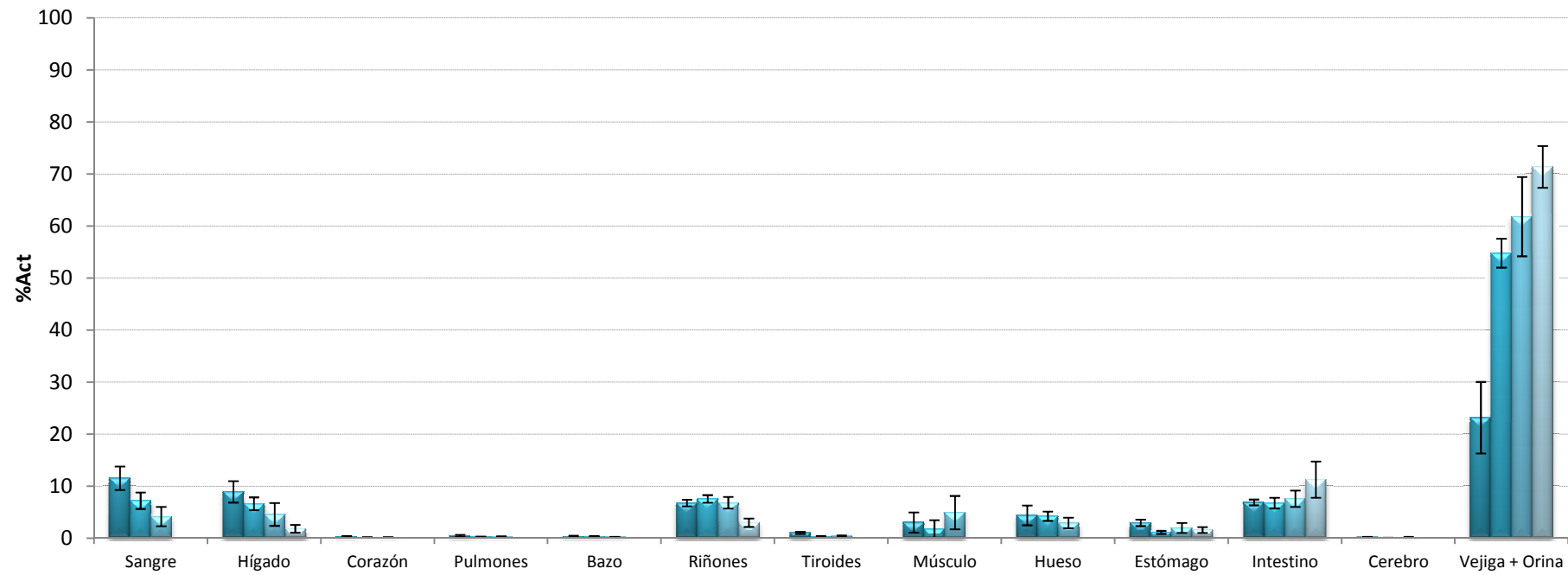


**Figura 69.** Gráfico de biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). Datos expresados como %Act/g.

**Tabla 25.** Biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). nd corresponde a medidas no detectables. Datos expresados como %Act.

Tejido	Tiempo			
	30 min	2 h	4h	24 h
	Porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act ± ds)			
Sangre	11,26 ± 2,26	7,24 ± 1,58	4,18 ± 1,86	nd
Hígado	8,93 ± 2,06	6,65 ± 1,23	4,60 ± 2,20	1,85 ± 0,74
Corazón	0,33 ± 0,11	0,18 ± 0,09	0,15 ± 0,10	nd
Pulmones	0,51 ± 0,19	0,28 ± 0,09	0,28 ± 0,11	nd
Bazo	0,36 ± 0,14	0,36 ± 0,10	0,25 ± 0,04	nd
Riñones	6,79 ± 0,64	7,58 ± 0,74	6,84 ± 1,12	3,01 ± 0,81
Tiroides	1,06 ± 0,19	0,33 ± 0,13	0,42 ± 0,15	nd
Músculo	3,04 ± 1,93	1,77 ± 1,73	4,96 ± 3,20	nd
Hueso	4,42 ± 1,91	4,25 ± 0,89	2,96 ± 1,02	nd
Estómago	2,98 ± 0,63	1,16 ± 0,29	2,00 ± 0,96	1,60 ± 0,57
Intestino	6,90 ± 0,56	6,78 ± 1,02	7,63 ± 1,58	11,29 ± 3,47
Cerebro	0,21 ± 0,09	0,08 ± 0,05	0,16 ± 0,11	nd
Vejiga + Orina	23,20 ± 6,86	54,81 ± 2,78	61,83 ± 7,62	71,40 ± 4,02

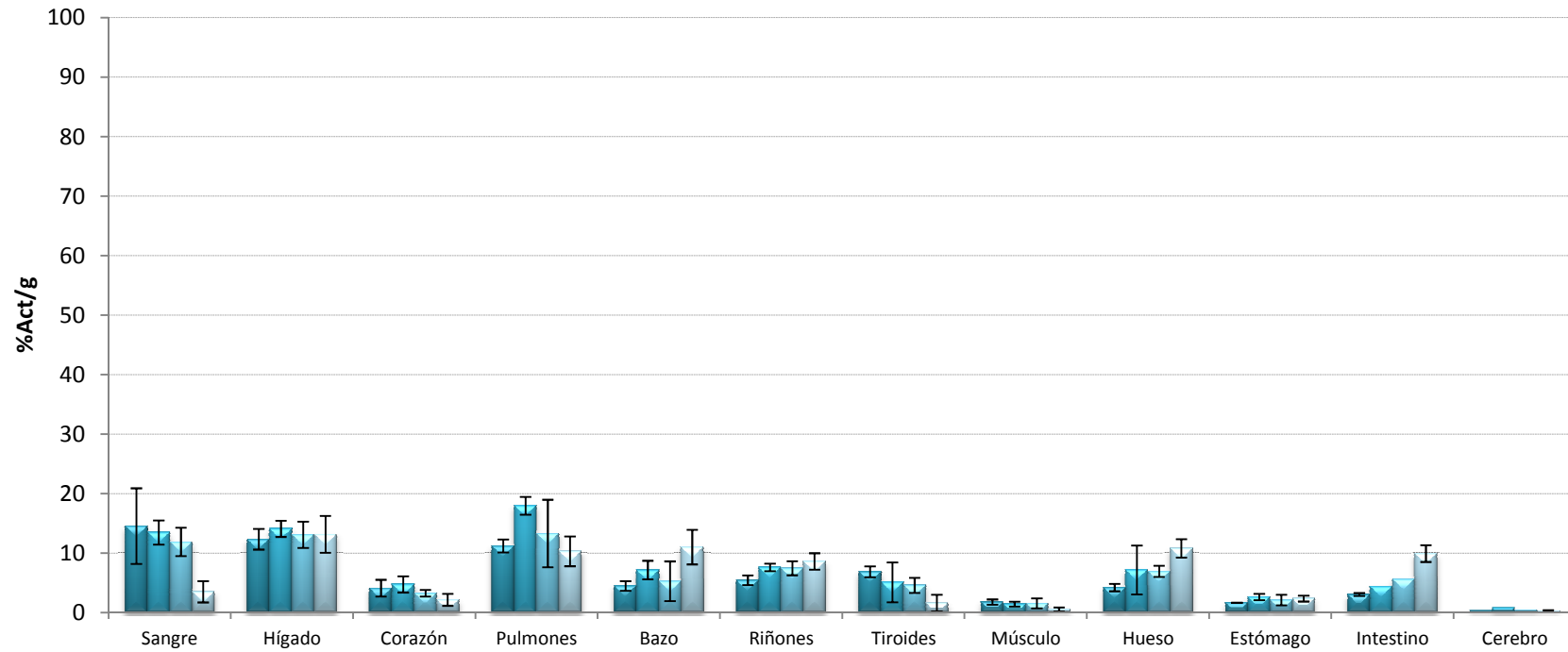




**Figura 70.** Gráfico de biodistribuciones de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). Datos expresados como %Act.

**Tabla 26.** Biodistribuciones de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=4). Datos expresados como %Act/g.

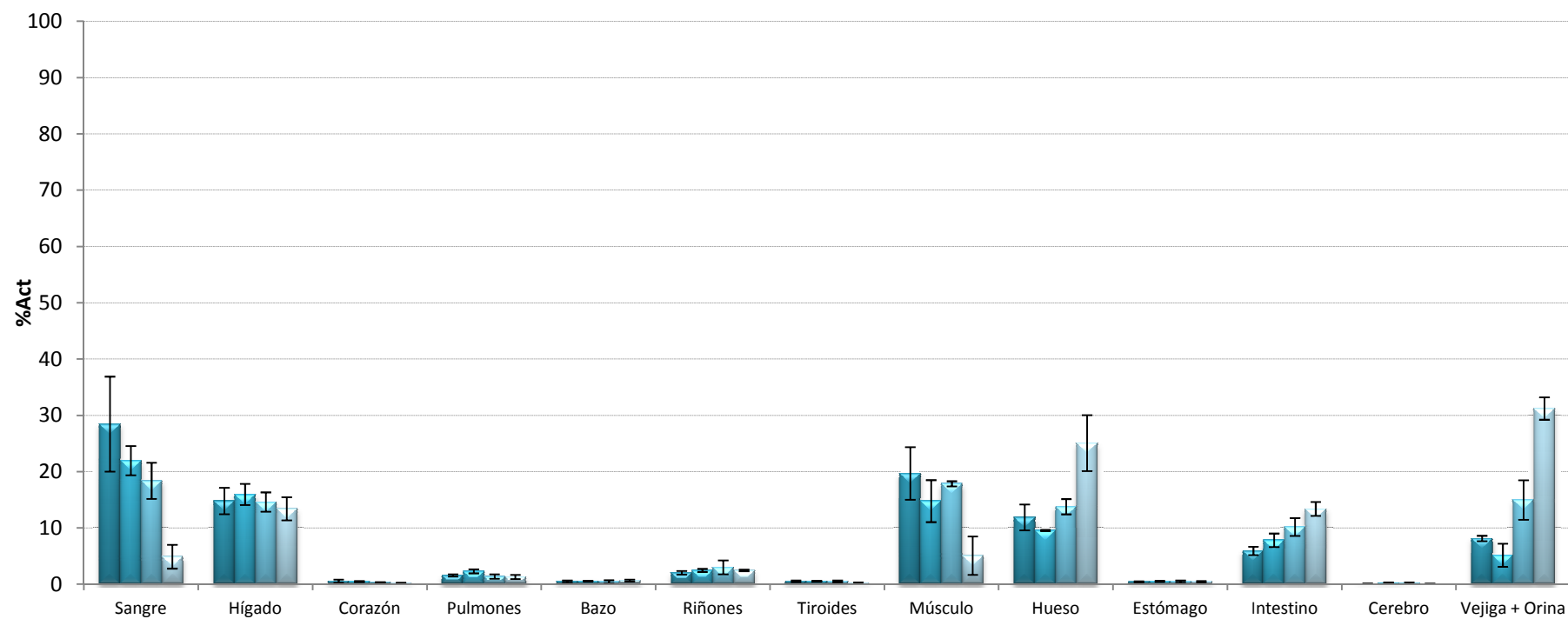
Tejido	Tiempo			
	30 min	2 h	4h	24 h
	Porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act/g ± ds)			
Sangre	12,99 ± 0,94	13,51 ± 2,03	11,93 ± 2,39	3,55 ± 1,79
Hígado	12,38 ± 1,75	14,12 ± 1,35	13,12 ± 2,21	13,19 ± 3,10
Corazón	4,16 ± 1,40	4,78 ± 1,35	3,31 ± 0,56	2,20 ± 1,01
Pulmones	11,23 ± 1,09	18,00 ± 1,50	13,34 ± 5,67	10,34 ± 2,49
Bazo	4,53 ± 0,81	7,21 ± 1,56	5,32 ± 3,34	11,06 ± 2,91
Riñones	5,48 ± 0,80	7,64 ± 0,62	7,50 ± 1,17	8,65 ± 1,38
Tiroides	6,91 ± 0,91	5,13 ± 3,33	4,63 ± 1,26	1,64 ± 1,39
Músculo	1,83 ± 0,44	1,48 ± 0,39	1,59 ± 0,84	0,57 ± 0,33
Hueso	4,25 ± 0,62	7,22 ± 4,11	6,98 ± 0,93	10,84 ± 1,55
Estómago	1,71 ± 0,03	2,66 ± 0,53	2,17 ± 0,88	2,40 ± 0,49
Intestino	3,08 ± 0,25	4,47 ± 0,99	5,69 ± 1,04	9,97 ± 1,41
Cerebro	0,39 ± 0,13	0,82 ± 0,51	0,50 ± 0,43	0,30 ± 0,16



**Figura 71.** Gráfico de biodistribuciones de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=4). Datos expresados como %Act/g.

**Tabla 27.** Biodistribuciones de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=5). Datos expresados como %Act.

Tejido	Tiempo			
	30 min	2 h	4h	24 h
	Porcentaje de actividad inyectada por gramo (%Act ± ds)			
Sangre	28,47 ± 8,44	21,99 ± 2,58	18,39 ± 3,21	4,92 ± 2,11
Hígado	14,80 ± 2,35	15,97 ± 1,88	14,63 ± 1,72	13,43 ± 2,04
Corazón	0,57 ± 0,27	0,49 ± 0,09	0,37 ± 0,05	0,21 ± 0,10
Pulmones	1,59 ± 0,21	2,32 ± 0,35	1,39 ± 0,40	1,34 ± 0,37
Bazo	0,49 ± 0,19	0,60 ± 0,03	0,47 ± 0,26	0,68 ± 0,16
Riñones	2,06 ± 0,34	2,48 ± 0,27	3,03 ± 1,25	2,48 ± 0,15
Tiroides	0,57 ± 0,14	0,58 ± 0,06	0,53 ± 0,15	0,20 ± 0,16
Músculo	19,71 ± 4,68	14,79 ± 3,73	17,87 ± 0,45	5,10 ± 3,39
Hueso	11,89 ± 2,30	9,58 ± 0,11	13,80 ± 1,36	25,08 ± 4,96
Estómago	0,45 ± 0,09	0,56 ± 0,09	0,50 ± 0,18	0,48 ± 0,12
Intestino	5,94 ± 0,76	7,83 ± 1,20	10,20 ± 1,58	13,41 ± 1,24
Cerebro	0,11 ± 0,04	0,24 ± 0,12	0,17 ± 0,20	0,09 ± 0,06
Vejiga + Orina	8,17 ± 0,48	5,17 ± 2,05	14,99 ± 3,51	31,23 ± 1,90



**Figura 72.** Gráfico de biodistribuciones de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga en ratones BALB-c normales a 30 min, 2 h, 4 h y 24 h post inyección (n=4). Datos expresados como %Act.

### 5.4.3 Estudios imagenológicos

Para estudiar *in vivo* el comportamiento del aptámero Sgc8-c-Alexa647 se realizaron imágenes *ex vivo* ya que la autofluorescencia de tejidos y pelaje del animal no permitían realizar el estudio con animal entero.

Los modelos tumorales de ratón se muestran por separado, tanto para los ratones BALB-c inoculados con células A20, como para los ratones C57BL/6 inoculados con células B16F1 (n=2).

Dos horas post inyección del aptámero Sgc8-c se hizo orinar al ratón y el mismo fue sacrificado por dislocación cervical. Los órganos disectados se muestran en las imágenes.

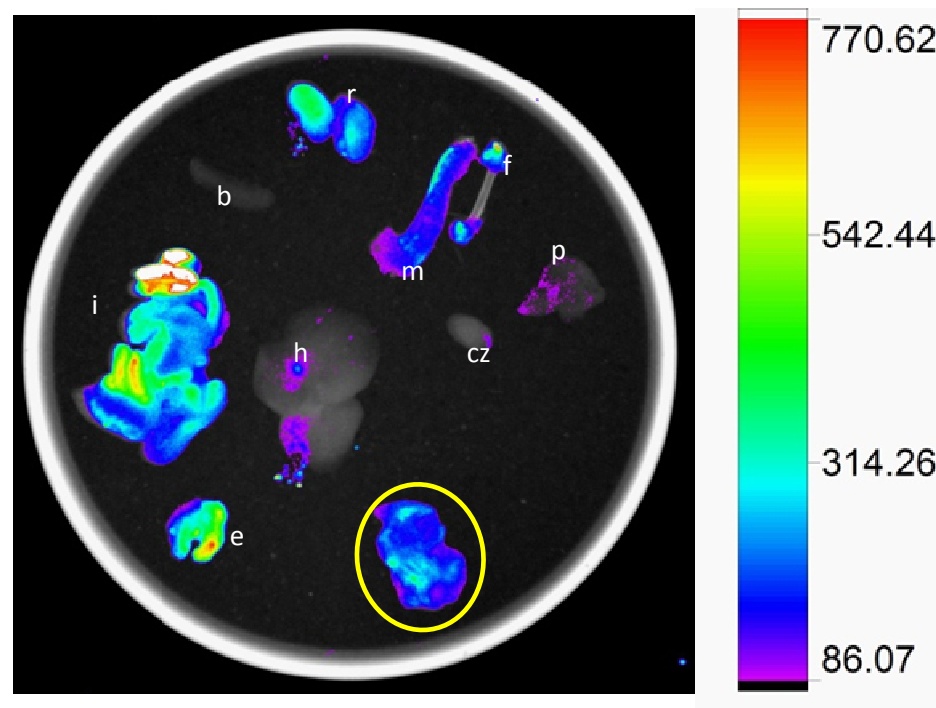
Las imágenes que se muestran a continuación (Figuras 73-77) fueron realizadas en el equipo In-Vivo MS FX PRO del Centro de Investigaciones Nucleares. Dichas imágenes se adquirieron 2 horas post inyección en modo fluorescencia y rayos-X. El láser de excitación utilizado se correspondió a 650 nm.

De la comparación de ambos modelos tumorales se observa una clara captación en los tumores de linfoma (células A20) comparados con los observados para el modelo de melanoma (células B16F1) (Figura 77).

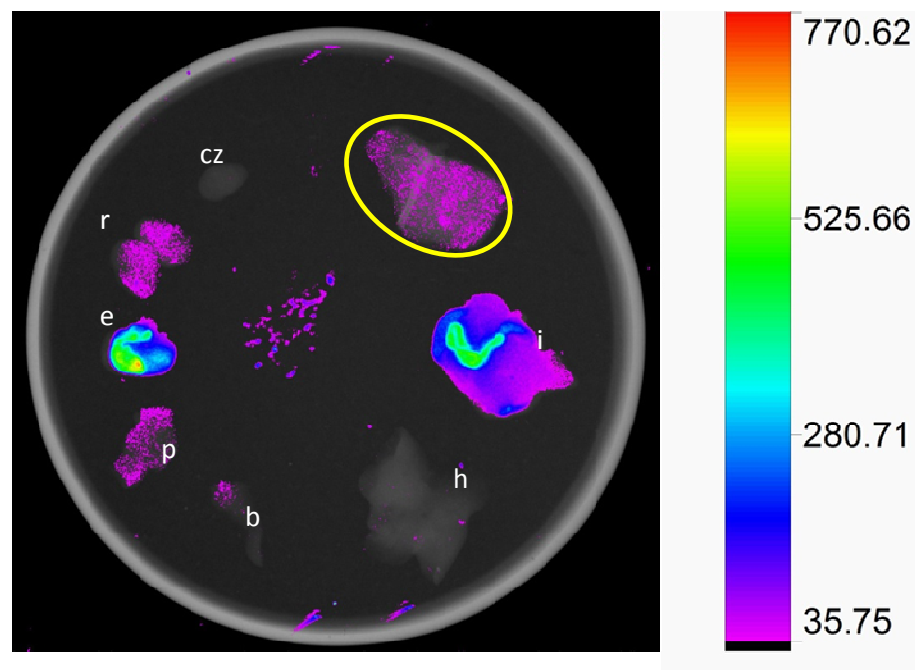
Sin tener en cuenta la captación en intestino y estómago, la relación entre hígado, bazo y riñones en comparación con el tumor fue sustancialmente diferente para los ratones con linfoma. No se observó lo mismo en el caso del modelo de melanoma.

Particularmente, uno de los ratones inoculados con células A20 mostró una captación que llamó la atención, tanto en una porción de la médula espinal como en la cabeza del fémur (Figura 73). No se tienen datos de anatomía patológica, ni se observó tejido diferente en términos macroscópicos para este tejido, pero esta observación podría indicar la presencia de metástasis a nivel de médula.

La captación en intestino y estómago puede estar relacionada a la ingesta de ración con alto contenido de componentes que aumenten la señal fluorescente.

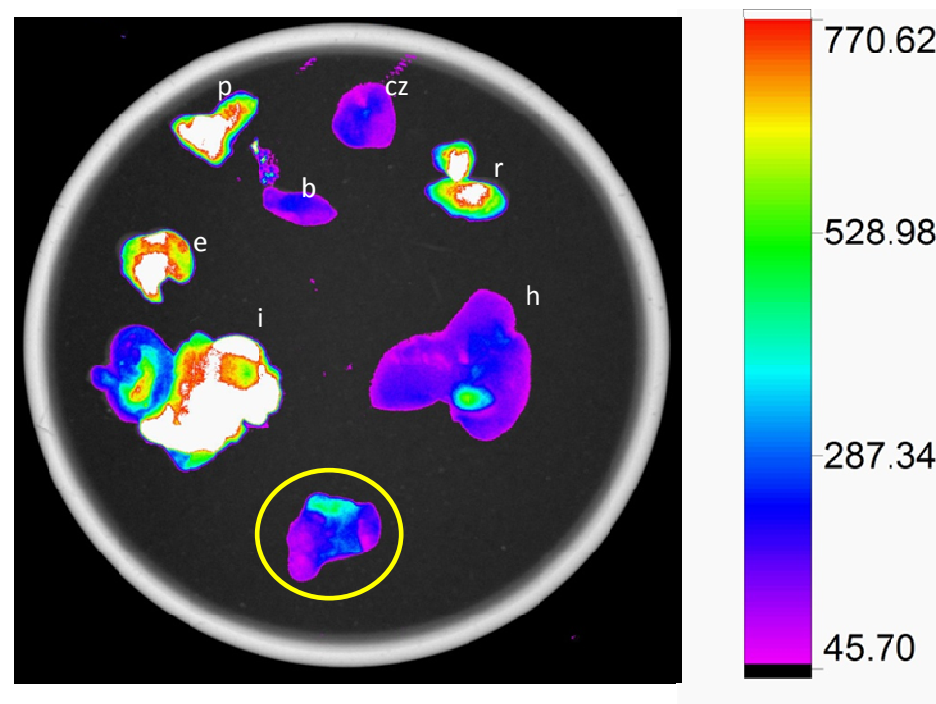


**Figura 73.** Imagen *ex vivo* adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 2 horas post inyección de 20  $\mu\text{g}$  de Sgc8-c-Alexa647. Ratón BALB-c inoculado previamente con células A20. En la imagen pueden observarse bazo(b), riñones(r), medula espinal(m), fémur(f), pulmones(p), corazón(cz), hígado(h), intestino(i), estómago(e) y tumor (círculo amarillo).

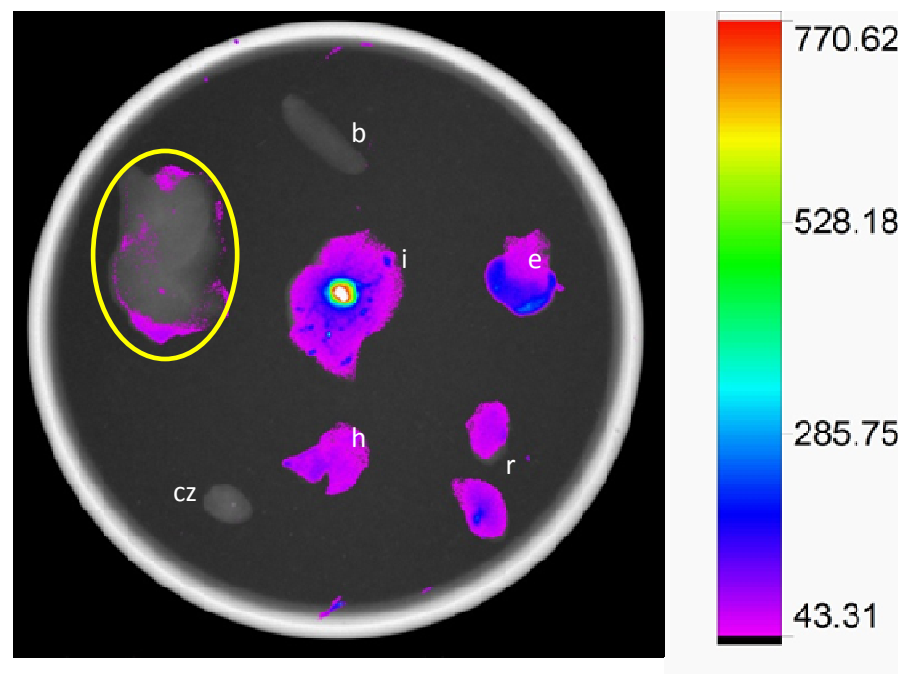


**Figura 74.** Imagen *ex vivo* adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 2 horas post inyección de 10 µg de Sgc8-c-Alexa647. Ratón BALB-c inoculado previamente con células A20. En la imagen pueden observarse bazo(b), riñones(r), pulmones(p), corazón(cz), hígado(h), intestino(i), estómago(e), y tumor (círculo amarillo).





**Figura 75.** Imagen *ex vivo* adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 2 horas post inyección de 20  $\mu\text{g}$  de Sgc8-c-Alexa647. Ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1. En la imagen pueden observarse bazo(b), riñones(r), pulmones(p), corazón(cz), hígado(h), intestino(i), estómago(e) y tumor (círculo amarillo).



**Figura 76.** Imagen *ex vivo* adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 2 horas post inyección de 10  $\mu$ g de Sgc8-c-Alexa647. Ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1. En la imagen pueden observarse bazo(b), riñones(r), corazón(cz), hígado(h), intestino(i), estómago(e) y tumor (círculo amarillo).

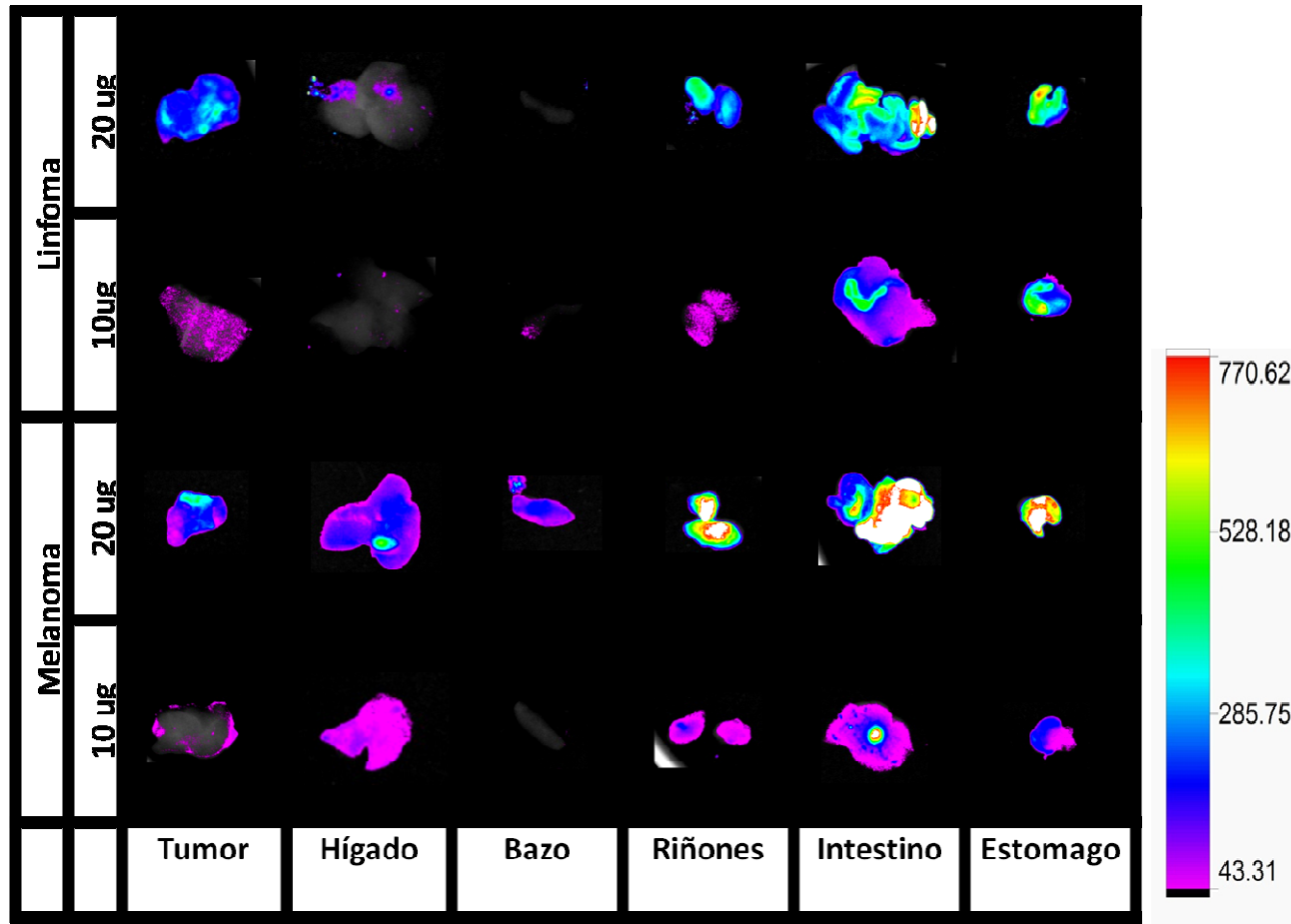


Figura 77. Imágenes ex vivo comparadas utilizando la misma escala de color. Intensidad normalizada en función de la escala.

Las imágenes que se muestran a continuación (Figura 78-85) fueron realizadas en el equipo In-Vivo MS FX PRO del Centro de Investigaciones Nucleares.

Las imágenes fueron adquiridas 2 horas post inyección y los tiempos de adquisición variaron entre 5-10 minutos, modo gamma y rayos-X. En algunos casos se realizó también la imagen a 24 horas post inyección.

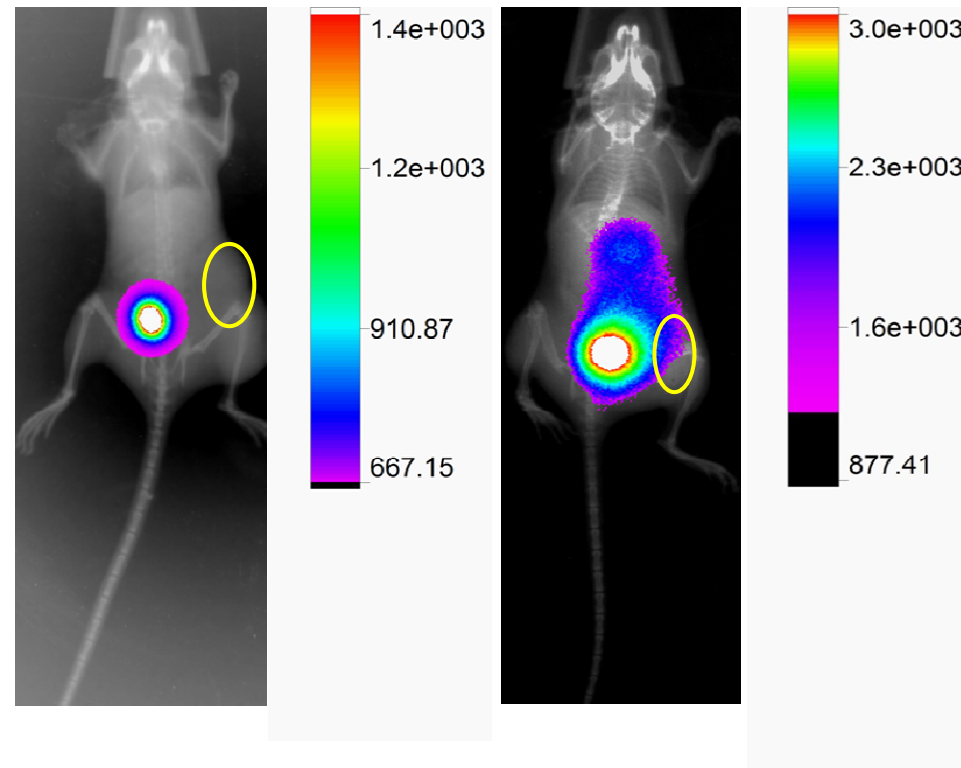
Previo a la adquisición el ratón fue anestesiado y se hizo orinar para disminuir la intensidad de actividad en vejiga.

Para ambos aptámeros marcados con Tecnecio-99m se observa alto contenido en vejiga y un remanente en hígado. Veinticuatro horas tras la inyección se sigue observando el mismo patrón de distribución, sin observar captación a nivel del tumor (Figuras 78-81, los modelos tumorales de ratón se ubican en la misma figura, tanto para los ratones BALB-c inoculados con células A20, como para los ratones C57BL/6 inoculados con células B16F1).

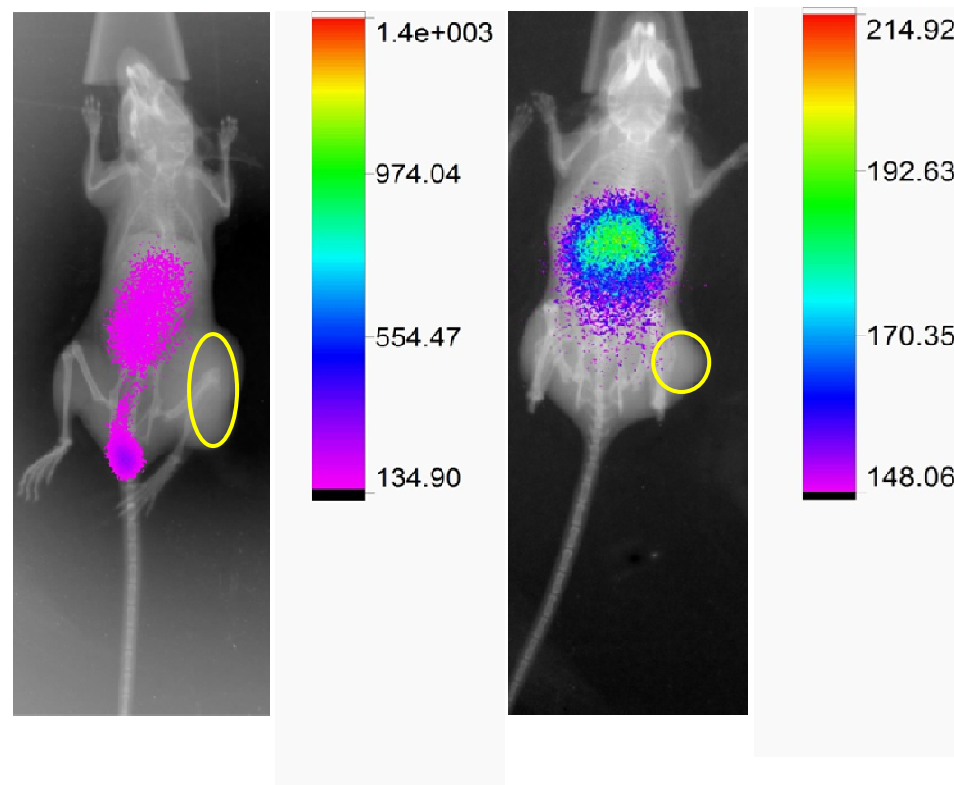
En el caso del Sgc8-c- $^{67}\text{Ga}$ -DOTA se observa alto contenido del agente de imagen a nivel abdominal, pero también en la zona del tumor (Figura 82). Veinticuatro horas tras la inyección se sigue observando el mismo patrón de distribución (Figuras 82-85). Para confirmar la captación por los tumores se realizó la imagen *ex vivo* de los órganos verificándose dicha hipótesis.

Para el modelo de linfoma no se observó captación tumoral en la imagen *ex vivo* (Figura 85). Inmediatamente, la captación en tumor y demás órganos fue verificada por estudios de biodistribución observándose relaciones Tumor/Sangre (%Act/g) y Tumor/Músculo (%Act/g) elevadas, principalmente a las 24 h post inyección del radiomarcado.

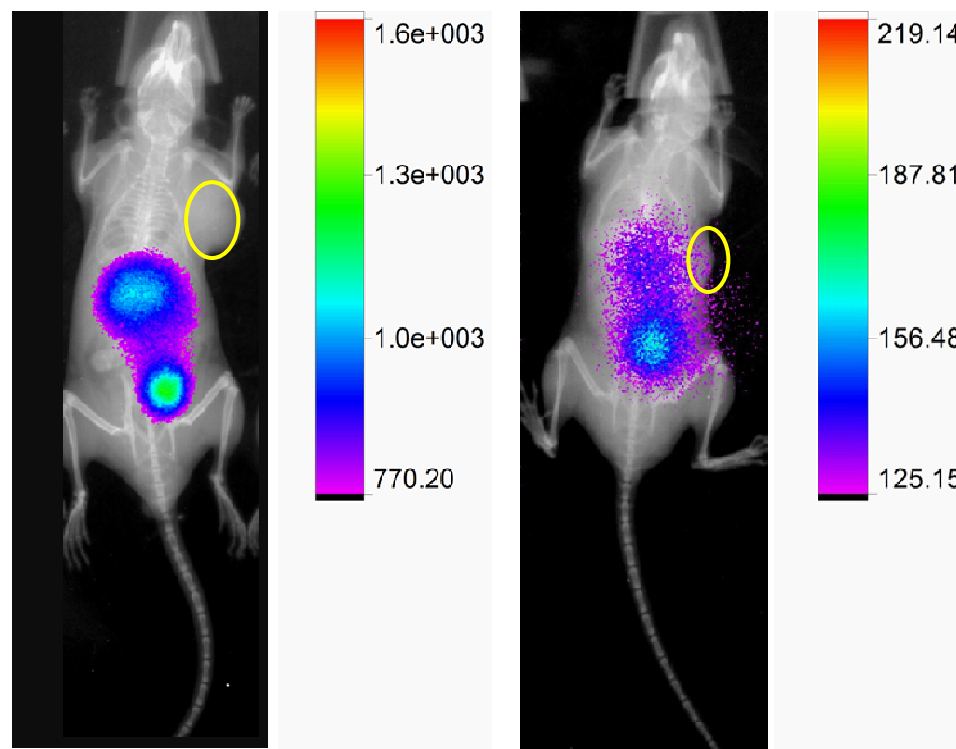
En el caso del linfoma el tumor era muy pequeño y claramente el equipo de imagen no permite observar la captación. Sin embargo, es el tumor que mayor relación Tumor/Sangre y Tumor/Músculo presenta (ver Figura 86).



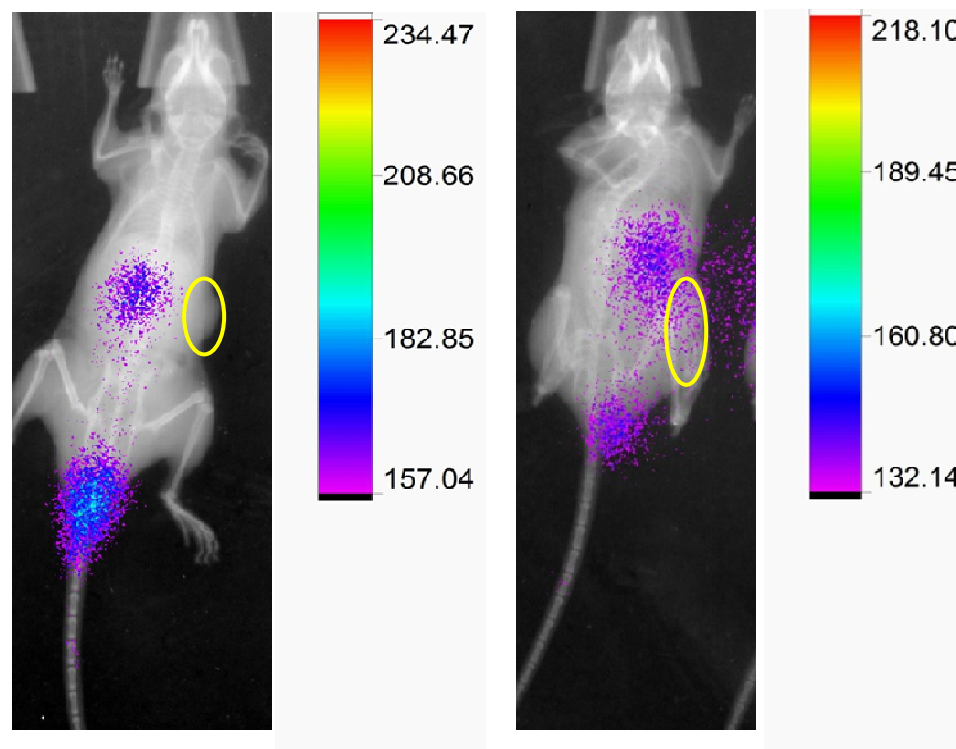
**Figura 78.** Imagen adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 2 horas post inyección de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc. A la izquierda se observa el ratón BALB-c inoculado previamente con células A20, tumor en miembro inferior (círculo amarillo). A la derecha se observa el ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1, tumor en miembro inferior (círculo amarillo).



**Figura 79.** Imagen adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 24 horas post inyección de Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc. A la izquierda se observa el ratón BALB-c inoculado previamente con células A20, tumor en miembro inferior (círculo amarillo). A la derecha se observa el ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1, tumor en miembro inferior (círculo amarillo).

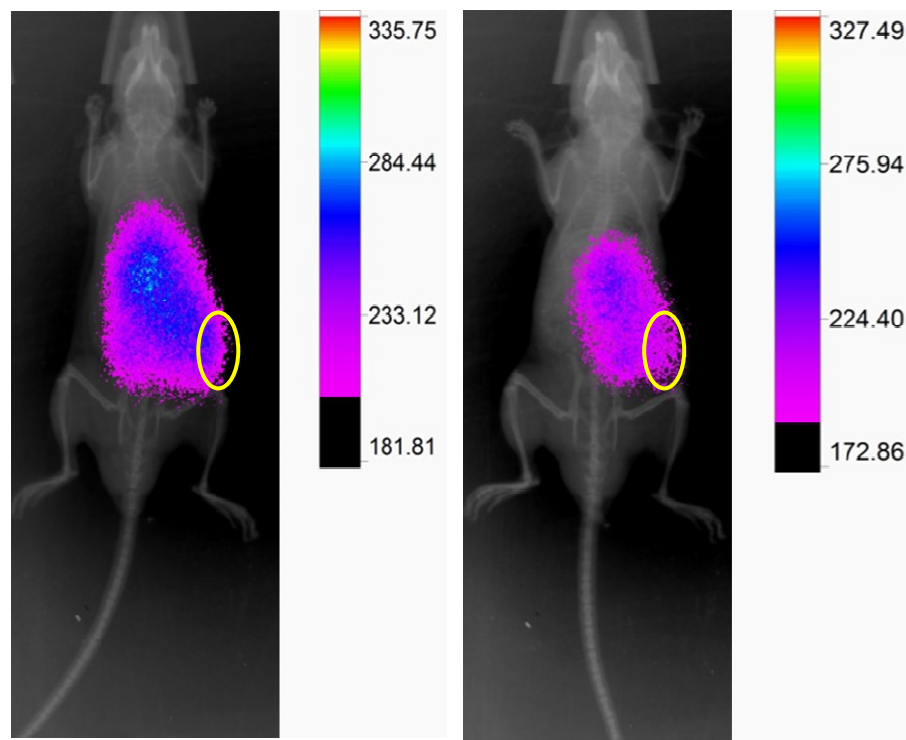


**Figura 80.** Imagen adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 2 horas post inyección de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc. A la izquierda se observa el ratón BALB-c inoculado previamente con células A20, tumor en miembro superior (círculo amarillo). A la derecha se observa el ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1, tumor en miembro superior (círculo amarillo).

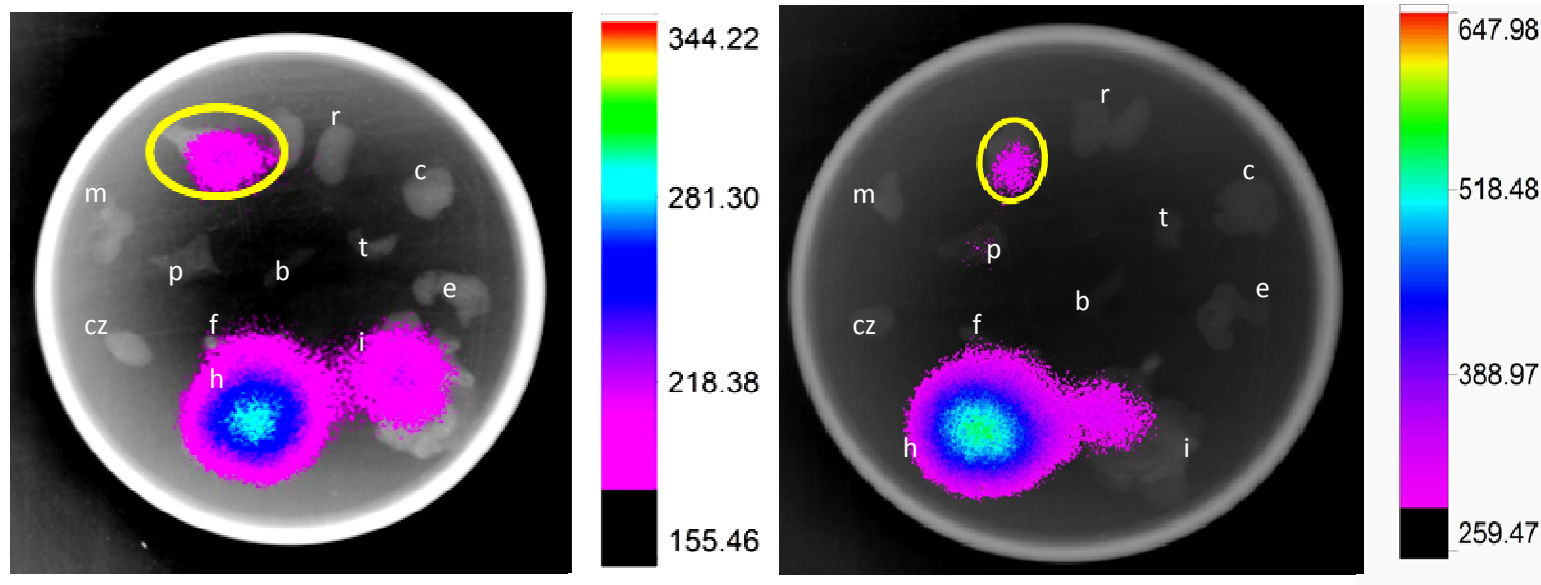


**Figura 81.** Imagen adquirida en equipo In-Vivo MS FX PRO 24 horas post inyección de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc. A la izquierda se observa el ratón BALB-c inoculado previamente con células A20, tumor en zona media (círculo amarillo). A la derecha se observa el ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1, tumor en miembro inferior (círculo amarillo)

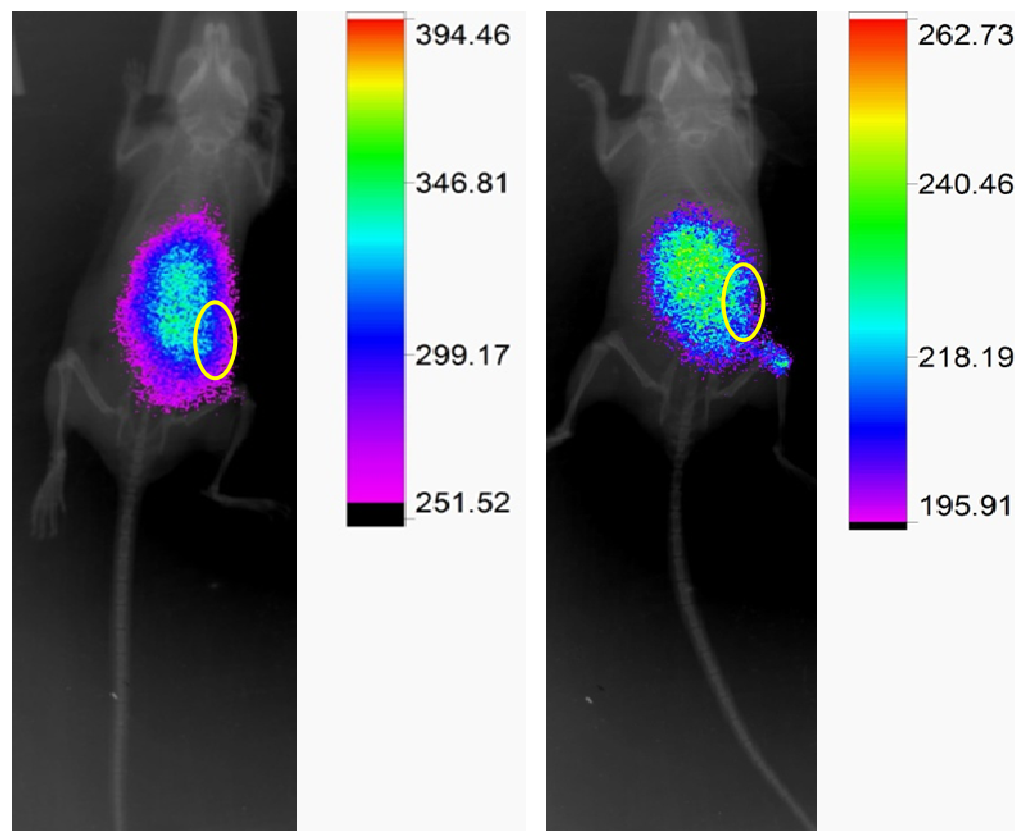




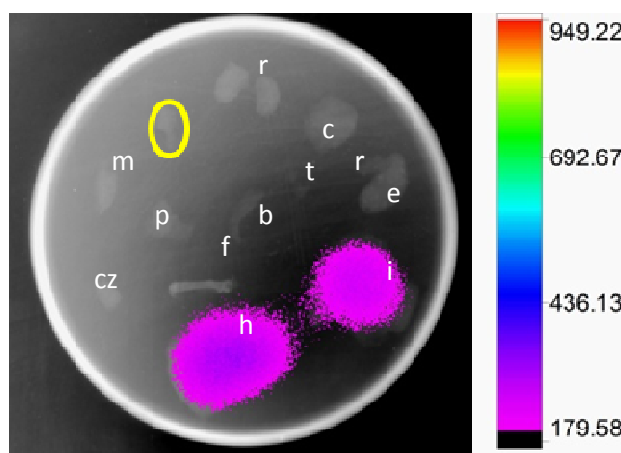
**Figura 82.** Imagen en el equipo In-Vivo MS FX PRO en ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1. Imagen adquirida 2 h (izquierda) y a 24 h (derecha) post-inyección de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga. Tumor en miembro inferior a la derecha (círculo amarillo).



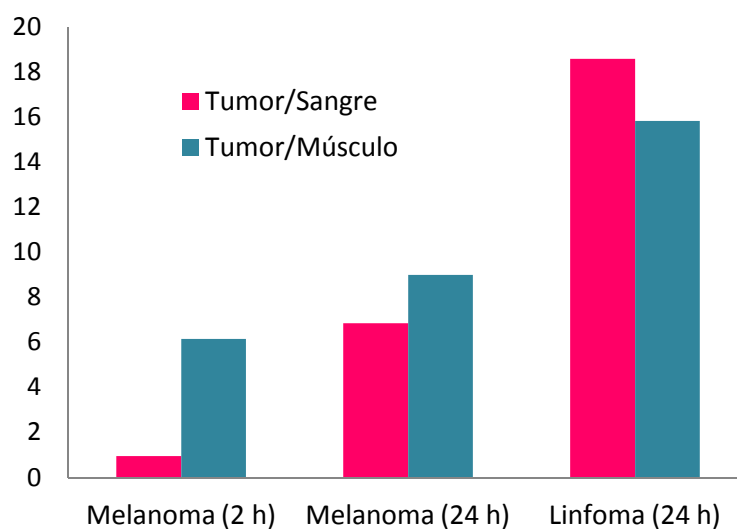
**Figura 83.** Confirmación de captación tumoral por imagen *ex vivo* de ratón C57BL/6 inoculado previamente con células B16F1 a 2 y 24 horas post-inyección de Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga (ver figura 82). En la imagen pueden observarse bazo(b), riñones(r), corazón(cz), hígado(h), intestino(i), estómago(e), pulmones(p), cerebro(c), músculo(m), tiroides(t), femur (f) y tumor (círculo amarillo).



**Figura 84.** Imagen en el equipo In-Vivo MS FX PRO en ratón BALB-c inoculado con A20 a 2 h (izquierda) y a 24 h (derecha) post-inyección con Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga. Tumor en miembro inferior a la derecha (círculo amarillo).



**Figura 85.** Confirmación de captación tumoral por imagen *ex vivo* de ratón BALB-c inoculado previamente con células A20 24 horas post-inyección con Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga. En la imagen pueden observarse bazo(b), riñones(r), corazón(cz), hígado(h), intestino(i), estómago(e), pulmones(p), cerebro(c), músculo(m), tiroides(t), femur (f) y tumor (círculo amarillo).



**Figura 86.** Gráfico las relaciones tumor/sangre y tumor/músculo a diferentes tiempos para la cuantificación mediante biodistribución de los ratones de las Figuras 83 y 85.

### 5.4.3.1 Micro-SPECT-CT

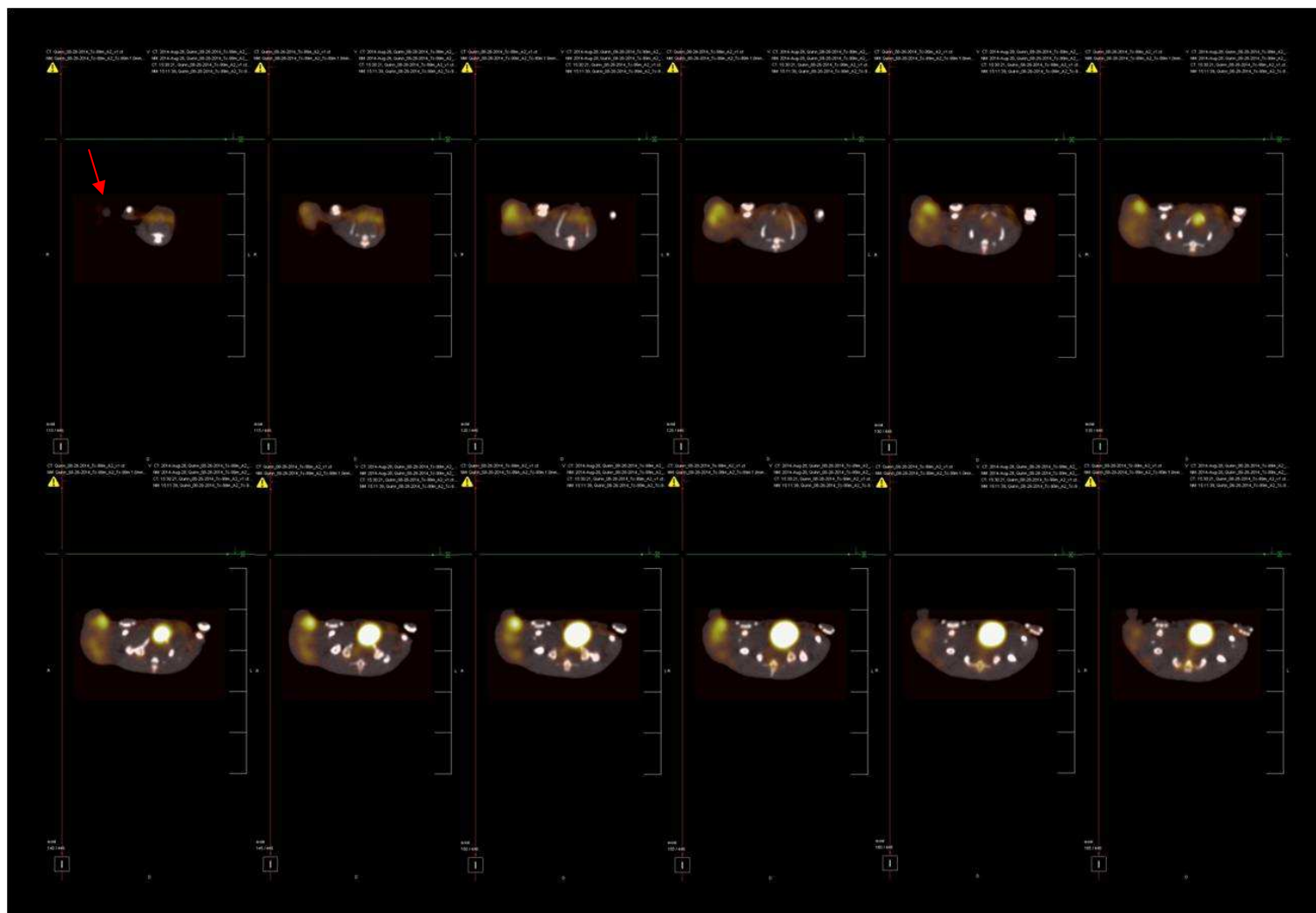
Fue posible realizar una imagen en un ratón inmunodeprimido inoculado con células humanas LS174T. La adquisición fue realizada en Micro-SPECT-CT perteneciente al VA Truman Hospital, Universidad de Missouri. Dicha imagen fue adquirida 2 horas post-inyección de 1 mCi de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc.

Previo a la adquisición el ratón fue anestesiado y debido a la alta eliminación en orina se hizo orinar al ratón.

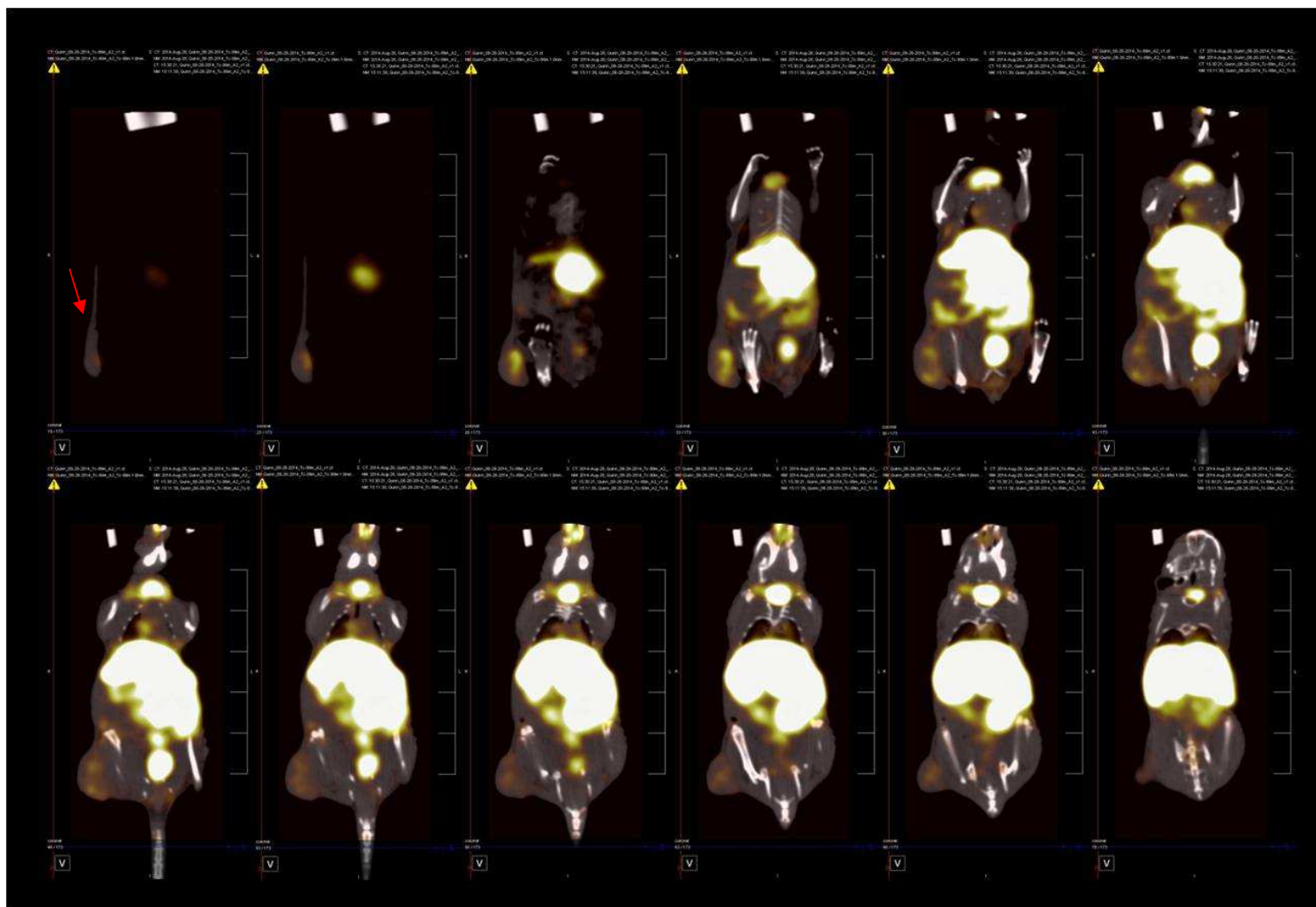
En las Figuras 87-89 se observan los diferentes cortes axial, coronal, y reconstrucción 3D, respectivamente (las flechas rojas indican la ubicación del tumor).

Para este caso es posible visualizar el tumor, si bien existe una alta señal para hígado y vejiga fundamentalmente.

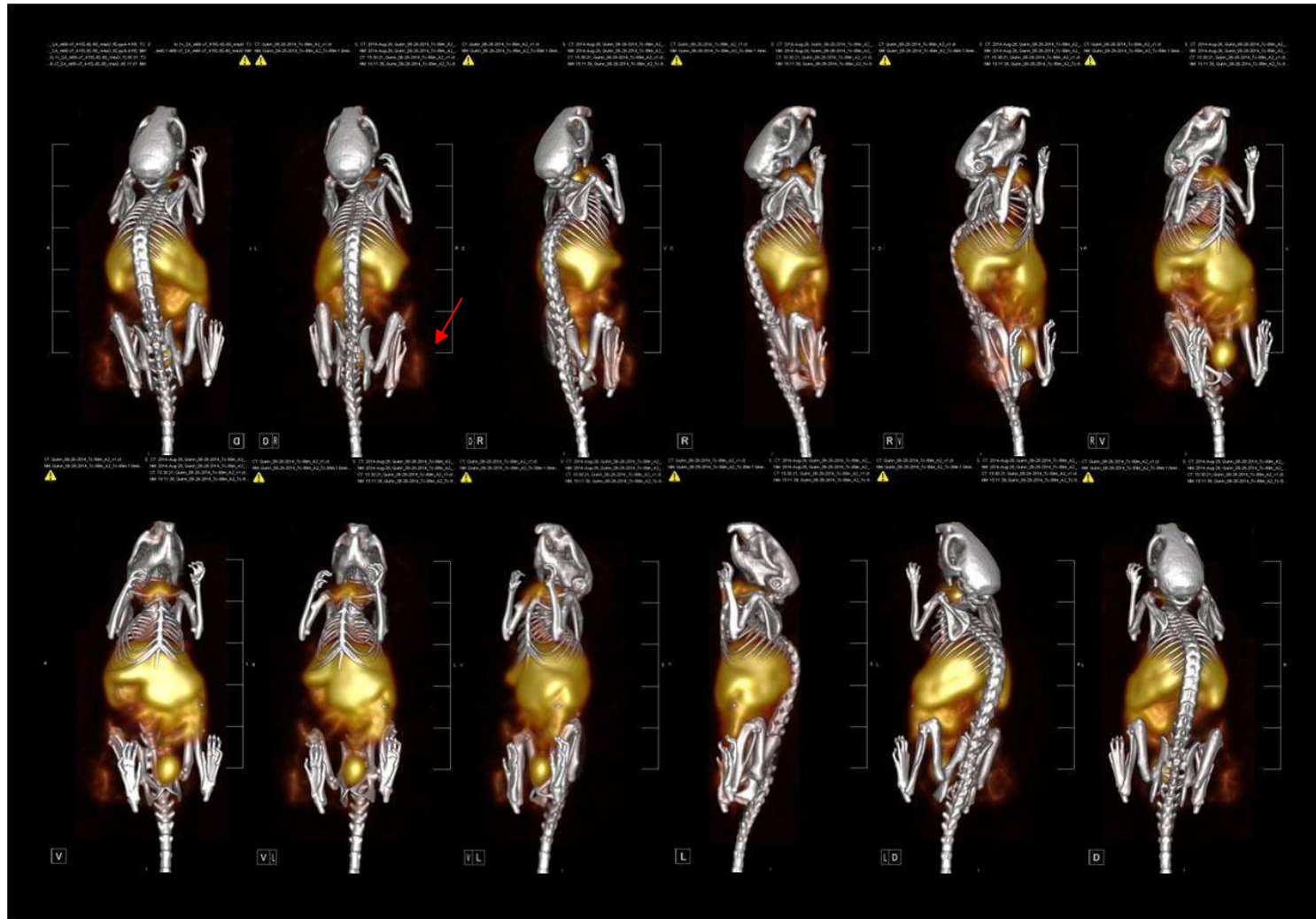
Asimismo es posible observar una alta captación en tiroides lo que puede indicar una desestabilización del aptámero marcado *in vivo*. Esto último no se observa para las imágenes adquiridas con los modelos tumorales anteriormente mencionados en el equipo In-Vivo MS FX PRO lo cual puede deberse a la diferencia de los modelos tumorales. Se realizó también la adquisición a 24 horas post-inyección pero los datos no fueron procesados y la imagen no se muestra debido a que la actividad presente en ratón a ese momento no fue suficiente para el equipamiento utilizado.



**Figura 87.** Micro-SPECT/CT. Cortes axiales de ratón SCID inoculado con LS174T 2 horas post-inyección de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc. El tumor se indica con flecha roja (arriba a la izquierda).



**Figura 88.** Micro-SPECT/CT. Cortes coronales de ratón SCID inoculado con LS174T 2 horas post-inyección de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc. El tumor se indica con flecha roja (arriba a la izquierda).



**Figura 89.** Micro-SPECT/CT. Imagen superpuesta de los cortes de ratón SCID inoculado con LS174T 2 horas post-inyección de Sgc8-c-HYNIC(Tfa)- $^{99m}\text{Tc}$ . El tumor se indica con flecha roja (arriba a la izquierda).



## **6. DISCUSIÓN**

Los nuevos emprendimientos tecnológicos, los avances en la comunicación y soportes de información han permitido mejorar sustancialmente el conocimiento del cáncer. Con la expectativa de vida creciente en los países desarrollados el cáncer seguirá siendo una patología que afectará a millones de personas en el tiempo por venir. Por este motivo constituye un gran desafío sostener el avance y la innovación en esta área.

Para el diagnóstico del cáncer las biopsias y cirugías son los procedimientos habituales en la clínica. Dichos procedimientos son invasivos y pueden perder de vista características particulares en base a la heterogeneidad tumoral y en muchos casos implican un enorme riesgo al paciente.

Debido a su característica no invasiva el uso de imágenes, la imagen molecular, permite evaluar la patología en su contexto siendo clave para entender el proceso tumoral sin perturbar el ambiente y proporcionando información adicional a los métodos convencionales. La estadificación tumoral, detección de metástasis, cirugía guiada, así como la cuantificación de una lesión son diferentes aplicaciones en esta área.

La pregunta es: ¿Qué obstáculos y qué desafíos son los que se debe enfrentar en cuanto a una aplicación de este tipo?

En este contexto, no cabe duda que es fundamental el conocimiento de marcadores tumorales y el desarrollo de nuevos agentes de imagenología molecular específicos de estos. Se puede inferir que las características principales de estos últimos deben ser una alta afinidad y especificidad por el blanco.

Tradicionalmente los agentes basados en anticuerpos, diseñados para reconocer específicamente marcadores tumorales, han sido muy estudiados como agentes imagenológicos. Sin embargo, en las últimas décadas han surgido y se han optimizado técnicas que permitirán cambiar esta tendencia.

Pequeñas moléculas, péptidos, oligonucleótidos y nanoestructuras también pueden actuar como agentes de reconocimiento específico por un blanco tumoral.

Asimismo, el generador de imagen, la estabilidad *in vivo* y la cinética de eliminación del agente imagenológico son características determinantes en la relación blanco/no blanco que se obtendrán en una imagen.

Tras su creciente desarrollo, y promisorias características, los aptámeros generan una nueva línea de investigación en esta área.

Su bajo costo en comparación con los anticuerpos, alta afinidad por su blanco, incluso con pesos moleculares bajos, y características fisicoquímicas fácilmente modificables hacen atractiva su evaluación como agentes de imagenología molecular.

Tras los resultados obtenidos de evaluaciones previas [113,114,135], el aptámero Sgc8-c, fue el foco de este estudio.

Según se describe en la bibliografía dicho aptámero, secuencia truncada del original sgc8, mostró unirse con muy buena afinidad a un receptor de superficie presente en las células CCRF-CEM posteriormente identificado como PTK7.

Se conoce que el receptor PTK7 participa en procesos normales de desarrollo pero su rol en cáncer ha sido poco estudiado. En función de los datos bibliográficos recopilados PTK7 podría estar sobreexpresado en varios tipos de tumores, incluso aquellos potencialmente metastáticos.

En este trabajo el aptámero Sgc8-c fue modificado con un grupo amino terminal el cual permitió su posterior reacción con ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo de otros compuestos, agentes bifuncionales, que permitirán adquirir imágenes.

Claro está que si bien las modificaciones incorporadas no varían de forma importante la masa molar del aptámero final, las características de dichos conectores podrían alterar sus propiedades.

Tras la obtención del aptámero Sgc8-c derivatizado en sus diferentes formas, se procedió a realizar el control de los mismos por RP-HPLC. Debido al tipo de columna utilizada para estos controles, podrían reflejar cambios en las interacciones débiles establecidas en la interfase debido a la incorporación de modificaciones al aptámero.

En primera instancia Sgc8-c fue marcado con el fluoróforo Alexa-647 y la capacidad del nuevo conjugado en su interacción biológica fue evaluada en cinco líneas celulares tumorales (A20, B16F1, CCRF-CEM, LS174T y Ramos) mediante citometría de flujo. Todas las líneas mostraron diferentes niveles de señal e intensidad lo cual es un indicativo de las diferencias de expresión del blanco en ellas, en el porcentaje de células de la línea que lo expresan, como en nivel de expresión y también en la afinidad por el blanco. Sorprendentemente, tras incubar el anticuerpo anti-PTK7-APC con dichas líneas, en las mismas condiciones, la única línea celular que mostró una señal significativa fue la línea celular CCRF-CEM, como se encuentra descrito en la bibliografía [157]. Si bien se describe que el aptámero Sgc8-c no competiría por el sitio de unión al anticuerpo aquí se evidencian diferencias importantes entre líneas celulares lo cual lleva a pensar en la posibilidad que se esté expresando otra isoforma de PTK7 o en un reconocimiento no específico de Sgc8-c por PTK7, como se ha descrito inicialmente.

Debido a la poca información respecto al receptor PTK7 este ensayo logra ver diferentes parámetros a tener en cuenta en el momento de considerar a esta biomolécula como potencial blanco para el desarrollo de agentes de imagen.

Cabe destacar que PTK7 no ha sido descrito en la línea celular A20, B16F1 y LS174T.

Asimismo la internalización de Sgc8-Alexa647 se siguió a través de microscopía confocal en estas mismas líneas celulares mostrando un patrón de agrupamiento muy característico. Si bien no se utilizó un marcador distintivo, las imágenes realizadas a diferentes tiempos y descripciones previas indican que la internalización mediante endosomas podría ser el camino de ingreso a la célula del aptámero marcado con Alexa647.

El reconocimiento específico de Sgc8-Alexa647, Sgc8-c-HYNIC(Iso)-<sup>99m</sup>Tc, Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc y Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga, por el receptor PTK7 se evaluó a través de la incubación con diferentes concentraciones de una variante del receptor puro, PTK7-1, con el conjugado. Los resultados mostraron solamente niveles detectables de unión para el Sgc8-c-DOTA-<sup>67</sup>Ga y se pudo entonces determinar la  $K_d$ .

Su aplicación como agente de imagenología molecular finalmente fue evaluada en dos modelos tumorales de ratón tras la adquisición de imágenes *ex vivo*, dos horas post-inyección intravenosa del Sgc8-c-Alexa647. En función de los resultados obtenidos de la citometría de flujo, fue interesante constatar que ambos modelos arrojasen diferentes resultados. En las imágenes de los tumores inducidos con células B16F1, en ratones C57BL/6, se observó una leve captación del Sgc8-c-Alexa647. Sin embargo, los tumores inducidos con células A20 en ratones BALB-c mostraron una importante captación. Si bien la línea celular A20 es la que muestra menor porcentaje de células positivas, es la que muestra mayor afinidad por el receptor.

Los resultados indican, entre otras cosas, la necesidad de recurrir igualmente a modelos *in vivo* e *in vitro*. La modificación del patrón de expresión celular *in vivo*, ya sea por la modificación de expresión del receptor consecuencia de la modificación de vías señalización, como por la proliferación diferencial *in vivo* de una población celular particular pueden hacer que los resultados nos sorprendan. No obstante, el microambiente tumoral propio de ambos modelos podría afectar la penetración en el tejido tumoral del agente imagenológico diferencialmente. De esta forma se destaca la necesidad de recurrir a modelos completos y variados para la evaluación de nuevos agentes imagenológicos.

Si bien los animales fueron afeitados previo a la adquisición de la imagen no se logró observar la fluorescencia *in vivo* y los animales tuvieron que ser sacrificados para observar los órganos por separado, *ex vivo*. Contar con modelos de ratones *nude* sería lo ideal para este tipo de estudios aunque la penetración en el tejido de la radiación sigue siendo una limitante en la aplicación de los fluoróforos en el NIR como generadores de imágenes.

Por otro lado, la disponibilidad y uso extendido del Tecnecio-99m, así como sus características fisicoquímicas óptimas para realizar estudios de SPECT impulsaron a explorar la marcación del Scg-8-c con este radionucleido. A su vez, la experiencia previa, de nuestro grupo, en el trabajo con HYNIC indica que las condiciones de marcación con tecnecio vía HYNIC son ideales cuando se trabaja con moléculas sensibles a condiciones extremas de temperatura y pH. Por ello Sgc8-c fue marcado con Tecnecio-99m a través del quelante bifuncional NHS-HYNIC. Se trabajó con NHS-HYNIC(Iso) de la forma que está disponible comercialmente y NHS-HYNIC protegido con un grupo Tfa [95]. En un exceso de HYNIC una alícuota del aptámero Sgc-8-c fue incubada por 45 minutos con las diferentes formas de NHS-HYNIC, según las condiciones de reacción descritas. Ambos conjugados, Sgc8-c-HYNIC(Iso) y Sgc8-c-HYNIC(Tfa) se marcaron con Tecnecio-99m en diferentes condiciones de reacción y se realizaron los controles necesarios para estudiar las condiciones óptimas de estabilidad y purificación.

Siendo que el coligando utilizado y el pertecnecio, así como el  $TcO_2$  son posibles impurezas presentes, las metodologías utilizadas fueron variadas y el método de control óptimo resultó ser mediante HPLC. Tanto el uso de la columna C18 como la columna de exclusión molecular SW300 fueron estudiados como métodos de purificación, esta última permitió obtener un purificado en disolución apto para la administración en animales. Sin embargo, el conjugado con HYNIC desprotegido (HYNIC(Iso)) mostró una mayor cantidad de picos en el sistema con columna C18 que pueden estar indicando diferentes situaciones estructurales, por modificaciones a través del grupo hidracino, dando conjugados con diferentes características cromatográficas.

Asimismo, la purificación por PD10 resultó ser la más adecuada para la purificación rápida de ambos radiomarcados. No pudo ser identificado un sistema cromatográfico en capa fina óptimo como sistema rápido de control.

La variante PTK7-1 del receptor puro fue incubada con Scg8-c radiomarcado con Tecnecio-99m. Tras la medición en el contador gamma no fue posible apreciar un aumento de la actividad conforme un aumento de la cantidad de receptor adsorbida.

Posiblemente existe gran cantidad de conjugado sin derivatizar con HYNIC en la mezcla por lo que no se va a marcar y las señales estarán disminuidas por esta impureza.

Los radiomarcados con Tecnecio-99m fueron evaluados en las líneas celulares indicadas anteriormente a diferentes tiempos de incubación. Pasadas la media hora no se observó un aumento significativo de la captación por las células si bien se observaron leves diferencias entre las líneas celulares estudiadas, nuevamente con la línea celular Ramos mostrando una intensa señal en comparación a las otras líneas celulares.

Los mismos modelos tumorales que los mencionados anteriormente fueron evaluados para los radiomarcados con Tecnecio-99m. Dos horas post-inyección por vía intravenosa de los radiomarcados se realizó la adquisición de imágenes en el equipo In-Vivo MS FX PRO. En ningún caso se detectó captación a nivel tumoral, observándose una rápida eliminación en orina y un remanente en hígado y riñones. En relación a esto último, estudios de biodistribución en ratones BALB-c normales a diferentes tiempos indicaron que la depuración sanguínea de los radiomarcados es muy rápida. Un 40 % aproximadamente de la actividad inicial inyectada es eliminada a los 30 minutos y los resultados indican que el resto de la actividad se estaría concentrando principalmente en hígado y riñones y en menor medida en intestino. La actividad en músculo, hueso y otros tejidos es muy baja a todos los tiempos evaluados.

Para conocer en mayor medida la cinética de eliminación de los radiomarcados se realizó un estudio farmacocinético en ratas normales extrayéndose muestras de sangre y orina hasta las 24 horas post-inyección. El procesamiento de los datos indicó que un ajuste bi-compartimental se adecua correctamente, en donde existe una eliminación muy rápida inicial que le prosigue a una fase lenta de eliminación. El valor de *clearance* renal obtenido para ambos radiomarcados concuerda con los datos obtenidos de la biodistribución.

Un estudio mediante Micro-SPECT/CT fue realizado en la Universidad de Missouri. Para dicho estudio se utilizó un ratón SCID con tumor generado a partir de la inyección de células humanas LS174T. El aptámero Sgc8-c-HYNIC(Tfa)-<sup>99m</sup>Tc fue inyectado por vía intravenosa y dos horas después la imagen fue adquirida. En este estudio se observa particularmente la captación por el tumor. En los cortes axiales se puede apreciar una captación moderada del tumor similar a la observada en la vejiga. Sin embargo, se puede observar un remanente en órganos como tiroides e intestinos lo que sugiere algún tipo de desestabilización del conjugado *in vivo*. Esto puede deberse a alguna característica propia del animal, o a algún problema en la purificación previo

a la inyección del aptámero radiomarcado. Deberán realizarse más estudios con un mayor número de animales y la cuantificación a través de estudios de biodistribución en ratones con tumor.

Por otro lado, los avances oncológicos actuales, sugieren la gran necesidad de asociar el diagnóstico y la terapia dirigidos hacia un mismo blanco molecular. Los criterios clásicos para informar de una remisión del cáncer en función del tamaño del tumor han dejado de ser valorados como tal, debido a que no evalúan la efectividad de la terapia en sí misma. De aquí surge el concepto de la teranóstica.

El término teranóstica se define como la integración del diagnóstico y una terapia específica [66]. El diagnóstico permitiría identificar pacientes, que puedan responder a una terapia particular y a su vez proporcionar eventual información en el seguimiento del paciente, monitoreando la respuesta a un tratamiento específico con el radiofármaco de diagnóstico. Actualmente este tipo de aplicaciones están siendo evaluadas por grandes compañías farmacéuticas con el fin de acelerar el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer y reducir el costo asociado a las mismas [69].

La teranóstica se basa en el empleo de una misma molécula específica para un blanco molecular ya sea con un emisor gamma para diagnóstico o con un emisor, alfa o beta, para terapia. No alcanza con mejorar las técnicas de detección si no se poseen estrategias terapéuticas acordes a evitar su diseminación y tampoco alcanza con tener buenas estrategias farmacológicas si no hay forma de destinarla a la totalidad de la población afectada.

El valor estratégico de este tipo de terapia se basa en el efecto de las radiaciones sobre el tejido blanco y en la selectividad de la localización de la fuente radiactiva (*in situ*) [63]. Los radionucleidos utilizados con este fin emiten radiación con una alta transferencia lineal de energía (LET) y entre ellos se encuentran emisores beta, alfa y emisores de electrones Auger.

Finalmente y con el objetivo de evaluar un agente imagenológico y teranóstico, o ambos, el aptámero Sgc8-c fue derivatizado con NHS-DOTA. DOTA es un quelante bifuncional que puede unir una variedad de metales. Entre ellos, se encuentran los radionucleidos emisores gamma como el  $^{67}\text{Ga}$ , emisores de positrones como el  $^{68}\text{Ga}$ , emisores beta como el  $^{90}\text{Y}$ , emisores alfa como  $^{204}\text{Ra}$ , y emisores mixtos como el  $^{177}\text{Lu}$ . En este estudio, Sgc8-c-DOTA fue marcado con Galio-67 y se realizaron estudios de estabilidad, así como estudios en las líneas celulares mencionadas anteriormente y también estudios de biodistribución, farmacocinéticos e imagenológicos.

Se ensayaron varias temperaturas de marcación y los mejores rendimientos se lograron a temperaturas superiores a los 45 °C. Sin embargo, no mejoró con el tiempo de incubación siendo 30 minutos el tiempo óptimo de marcación. Los ensayos celulares arrojan resultados similares a los de Sgc8-c radiomarcado con Tecnecio-99m y los estudios en animales mostraron comportamientos diferentes de los anteriores agentes tanto en la farmacocinética y biodistribución. En esta última, la distribución del aptámero en ratones normales pareció ser más homogénea si bien baja para todos los órganos.

En las imágenes fue posible observar una muy alta captación tumoral para los modelos ensayados, principalmente en el modelo de ratón C57BL/6 inyectado con células de melanoma B16F1. Sin embargo la confirmación por biodistribución de la captación en tumor indicaría que el tumor A20 posee un %Act/g y si es comparado con el valor en sangre y músculo da relaciones blanco/no blanco extremadamente altas, incluso mayor que para el modelo de melanoma. Este resultado se condice con los resultados de las imágenes *ex vivo* del Sgc8-c-Alexa647.

En todos los casos de las radiomarcaciones no se observa la afectación de la estructura del aptámero por RP-HPLC, si bien existe gran diferencia en los coeficientes de reparto hallados. Esto podría afectar de manera significativa la unión a su receptor y explicar las diferencias en el comportamiento *in vitro* e *in vivo*.

Si bien su mediana masa molecular no es una barrera para la buena afinidad y especificidad está claro que pequeñas modificaciones, como en una sola base, deben ser tenidas muy en cuenta y evaluar cómo afecta la misma [158]. Particularmente estas características no son solo afectadas por el cambio de tamaño sino de lipofilicidad, lo que puede repercutir en la interacción a nivel celular de la molécula en cuestión [193].

La estabilidad en suero fetal bovino, la cual representaría la estabilidad *in vivo* de los aptámeros evaluados, muestra lo que es muy discutido en la bibliografía de aptámeros. Su estabilidad podría verse enormemente afectada *in vivo*. Sin embargo, es importante que aun así se logren ver captaciones específicas por el tumor.

Es evidente que queda mucho por explorar en cuanto de aptámeros se habla. En este estudio se realizó un análisis bibliográfico de los aptámeros como agentes de imagenología molecular. Realmente son pocas las experiencias exitosas encontradas que lograron prosperar a una prueba fehaciente de sus posibilidades de agente imagenológico. Si bien algunos autores han podido realizar radiomarcaciones y



evaluar en modelos murinos, el esfuerzo no parece suficiente para lograr la obtención de una buena imagen.

Se deriva de aquí, que aún queda por realizar un trabajo más intenso para caracterizar mejor estas biomoléculas.

Aún hay cosas que no se comprenden respecto al comportamiento *in vivo* de ciertos compuestos. Es sabido que el microambiente tumoral así como la vasculatura y demás estructuras juegan un rol fundamental en el acceso de compuestos a las células tumorales. Incluso mecanismos de eflujo celulares permiten evadir las posibles estrategias que se puedan desarrollar. En base a ello es que, constantemente, se buscan diferentes estrategias buscando mejorar el acceso al blanco así como generar mayor especificidad.

Si se logra elevar la relación blanco/no blanco entregando fármacos de manera más efectiva al tumor se mejoraría profundamente la sensibilidad de nuevas metodologías. Pero la efectividad en el acceso a la zona patológica es simplemente la puerta de entrada. No se debe perder la idea que para mejorar la relación blanco/no blanco deben ser mejorados otros aspectos como el tiempo de residencia en el organismo, la eliminación del fármaco del organismo, la evasión del sistema inmune y otros factores. Todos estos componentes tienen características esenciales para lograr el fin en cuestión. Por ello muchos fármacos han fracasado en el intento y es necesario seguir buscando. No es al azar pero está claro que muchos factores influyen en la elección de la estrategia ideal. Y es en busca de ello por lo que se trabaja constantemente.

Sin duda las características heterogéneas del cáncer hacen necesario un enfoque multidisciplinario para atender sus causas así como su desarrollo.

Si bien ha habido grandes avances en la imagenología en este campo, siguen existiendo dificultades en la estadificación y la detección de persistencia o recaída de la enfermedad, lo cual condiciona el manejo y la sobrevida de los pacientes. La imagenología convencional se enfocaba en ver la ubicación y extensión de las zonas afectadas e intenta generar, ahora, metodologías más sensibles y con mayor información.

Obtener agentes de imagenología con mejor sensibilidad y especificidad utilizando agentes imagenológicos de fácil disposición y económicamente accesible tendría un gran impacto en estos aspectos.

Las nuevas estrategias de imagenología molecular van conforme entonces con la patología en la cual se va a intervenir así como en las tecnologías seleccionadas y no menos importante con el diseño y la evaluación del agente imagenológico a administrar. Diseñar y construir un agente imagenológico eficaz es todo un desafío y conlleva numerosas etapas así como enormes costos [194].

La tecnología híbrida constituye el cambio en la información adquirida y expande la visión a futuro de mejores y más rápidos resultados. El enfoque macroscópico y sintomático será tan valioso como la microestructura y patrones moleculares, base de las estrategias que vendrán.

## **7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

En este trabajo se lograron evaluar cuatro potenciales agentes de imagenología molecular

Los estudios preliminares muestran que las modificaciones incorporadas cambian sustancialmente las características fisicoquímicas de las sondas obtenidas

Los estudios *in vitro* muestran la unión a varias líneas celulares, con diferencias entre si. PTK7 no ha sido reportado en algunas de ellas.

Asimismo, los estudios *in vivo* arrojan características interesantes en cuanto a su biodistribución

Los ensayos imagenológicos muestran una importante captación a nivel de tumores lo que alienta a seguir con los estudios y caracterizar mas extensamente ya sean los agentes estudiados como el blanco tumoral

Respecto a estudios futuros será necesario mejorar la purificación tras las conjugaciones y realizar mejor caracterización de los radiomarcados. También los estudios de biodistribucion enmodelos tumorales de raton son estudios que deberán realizarse para cuantificar cuanto es lo que realmente se estaría acumulando en la zona afectada.

## **8. PROYECTOS Y PUBLICACIONES**

Este trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones Nucleares. Algunos estudios puntuales fueron realizados también en la Universidad de Missouri-US.

### **Proyecto Nuevas Estrategias de Imagenología Molecular en Cáncer**

Proyecto financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación, FCE\_2013\_100741.

Responsable: Victoria Calzada

### **Proyecto Investigación y desarrollo de aptámeros modificados para la producción de Biofármacos Teragnósticos**

Proyecto financiado por el Centro Argentino Brasileño de Biotecnología, CABBIO\_2014\_02.

Responsables: Ralph Santos-Oliveira (Sociedad Brasileira de Radiofarmacia-Brasil), Albertina Moglioni (UBA-Argentina, Hugo Cerecetto (UdelaR-Uruguay)

### **Artículo: Radiolabeled PTK7 targeting aptamer: challenges and approaches**

Calzada, V.; Moreno, M.; Newton, J.; González, J.; Fernández, M.; Gambini J.P.; Chabalgoity, A.; Deutscher, S.; Quinn, T.; Cabral, P.; Cerecetto, H. En redacción

### **Artículo: Aptamer-HYNIC-99mTc: a molecular imaging agent**

Calzada, V.; Garcia, M.F.; Moreno, M.; Ibarra, M.; Zhang, X.; Chabalgoity, A.; Newton, J.; González, J.; Fernández, M.; Deutscher, S.; Cabral, P.; Cerecetto, H.; Quinn, T. En redacción

### **Teranostic aptamers: Aptamer-DOTA-<sup>67</sup>Ga**

Calzada, V.; Gambini, J.P.; González, J.; Fernández, M.; Ibarra, M.; Moreno, M.; Chabalgoity, A.; Deutscher, S.; Cerecetto, H.; Quinn, T. Cabral, P. En redacción

Dos resúmenes fueron presentados en congresos internacionales (modalidad poster):

- TERACHEM 2014 - Bressanone-Italy, September 10-13, 2014
- ISRS2015 - Columbia, MO-USA, Mayo 22-30, 2015

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

- [1] <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- [2] Fidler, J. Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.*, 38:2651-2660, 1978.
- [3] Michor, F.; Iwasa, Y.; Nowak, M.A. Dynamics of cancer progression. *Nat. Rev.*, 4: 197-206, 2004.
- [4] American Cancer Society. Atlanta: American Cancer Society. 2004.
- [5] <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
- [6] [http://www.urucan.org.uy/uilayer/ve/Informe\\_2010\\_RNC%20\\_Sintesis\\_datos\\_estadisticos.pdf](http://www.urucan.org.uy/uilayer/ve/Informe_2010_RNC%20_Sintesis_datos_estadisticos.pdf)
- [7] Balmain, A.; Gray, J.; Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nat. Genet.*, 33:238-244, 2003.
- [8] Pérez-Losada, J.; Castellanos-Martín, A.; Mao, J.H. Cancer evolution and individual susceptibility. *Integr. Biol.*, 3:316-28, 2010.
- [9] Perera, F.P. Environment and cancer: Who are susceptible? *Science*, 278:1068-73, 1997.
- [10] Bizarri, M.; Cucina, A. Tumor and the microenvironment: A chance to reframe the paradigm of carcinogenesis? *Biomed. Res. Int.*, 1-9, 2014.
- [11] Subik, K.; Lee, J.; Baxter, L.; Strzepek, T.; Costello, D.; Crowley, P.; Xing, L.; Hung, M.; Bonfiglio, T.; Hicks, D.G.; Tang, P. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl)*, 4:35-41, 2010.
- [12] Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *BBA*, 1805(1):105-17, 2010.
- [13] Dexeus, S.; Torrent, J.J.; Dexeus, D.; Pascual, M.A.; Surís, J.C. Risk factors, prognostic and screening in ovarian cancer. *Prog. Obstet. Gynecol.*, 43:341-353, 2000.
- [14] Shaha, A.R.; Shah, J.P.; Loree, T.R. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann. Sur. Onc.*, 3:534-538, 1996.
- [15] Histed, S.N.; Lindenberg, M.L.; Mena, E.; Turkbey, B.; Choyke, P.L.; Kurdziel, K.A. Review of functional/anatomical imaging in oncology. *Nucl. Med. Commun.*, 33(4):349-61, 2012.
- [16] Kurdziel, K.A.; Ravizzini, G.; Croft, B.Y.; Tatum, J.L.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. The evolving role of nuclear molecular imaging in cancer. *Expert. Opin. Med. Diag.*, 2(7): 829-842, 2008.
- [17] Mankoff, D.A.; Link, J.M.; Linden, H.M.; Sundararajan, L.; Krohn, K.A. Tumor receptor imaging. *J. Nucl. Med.*, 49(2):149-63, 2008.



- [18] Weissleder, R.; Pittet, M.J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*, 452(7187):580-589, 2008.
- [19] Lecchi, M.; Ottobriani, L.; Martelli, C.; Del Sole, A.; Lucignani, G. Instrumentation and probes for molecular and cellular imaging. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 51(2):111-26, 2007.
- [20] Palestro, C.J. Nuclear medicine and the failed joint replacement: Past, present, and future. *World J. Radiol.*, 28;6(7):446-58, 2014.
- [21] Grimm, J.; Kirsch, D.G.; Windsor, S.D.; Kim, C.F.; Santiago, P.M.; Ntziachristos, V.; Jacks, T.; Weissleder R. Use of gene expression profiling to direct *in vivo* molecular imaging of lung cancer. *PNAS*, 102:14404-09, 2005.
- [22] Weissleder, R.; Mahmood, U. Molecular Imaging. *Radiology*, 219(2):316-33, 2001.
- [23] Neves, A.A.; Brindle, K.M. Assessing responses to cancer therapy using molecular imaging. *BBA*, 1766(2)242-61, 2006.
- [24] Briendle, K. New approaches for imaging tumour responses to treatment. *Nat. Rev.*, 8(2):94-107, 2008.
- [25] Gibbs, S.L. Near Fluorescence for image-guided surgery. *Q. Imag. Med Surg.*, 2(3):177-87, 2012.
- [26] Tichauer, K.M.; Samkoe, K.S.; Sexton, K.J.; Hextrum, S.K.; Yang, H.H.; Klubben, W.S.; Gunn, J.R.; Hasan, T.; Pogue, B.W. *In vivo* quantification of tumor receptor binding potential with dual-reporter molecular imaging. *Mol. Imag. Biol.*, 14(5):584-92, 2012.
- [27] Oishi, K.; Faria, A.V.; Yoshida, S.; Chang, L.; Mori, S. Quantitative evaluation of brain development using anatomical MRI and diffusion tensor imaging. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 31(7):512-24, 2013.
- [28] Policard, A. Étude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *Soc. Biol. Fil.*, 91:1423-24, 1924
- [29] Auler, H.; Banzer, G. Untersuchungen ueber die Rolle der Porphyrine bei geschwulstranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforsch*, 53:65-68, 1942.
- [30] Chance, B. Optical method. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 20:1-28., 1991.
- [31] Frangioni, J.V. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7: 626-34, 2003.
- [32] Ramanujam, N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues. *Neoplasia*, 2(1-2):89-117, 2000.
- [33] Tatsuta, M.; Iishi, H.; Ichii, M.; Baba, M.; Yamamoto, R.; Okuda, S.; Kikuchi, K. Diagnosis of gastric cancers with fluorescein-labeled monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen. *Lasers Surg. Med.*, 9:422-26, 1989.

- [34] Pelegrin, A.; Folli, S.; Buchegger, F.; Mach, J.P.; Wagnières, G.; van den Bergh, H. Antibody-fluorescein conjugates for photoimmunodiagnosis of human colon carcinoma in nude mice. *Cancer*, 67:2529-37, 1991.
- [35] van Dam, G.M.; Themelis, G.; Crane, L.M.; Harlaar, N.J.; Pleijhuis, R.G.; Kelder, W.; Sarantopoulos, A.; de Jong, J.S.; Arts, H.J.; van der Zee, A.G.; Bart, J.; Low, P.S.; Ntziachristos, V. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- $\alpha$  targeting: first in-human results. *Nat. Med.*, 17(10):1315-19, 2011.
- [36] Schaafsma, B.E.; Verbeek, F.P.; Rietbergen, D.D.; van der Hiel, B.; van der Vorst, J.R.; Liefers, G.J.; Frangioni, J.V.; van de Velde, C.J.; van Leeuwen, F.W.; Vahrmeijer, A.L.; Clinical trial of combined radio- and fluorescence-guided sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Br. J. Surg.*, 100(8):1037-44, 2013.
- [37] Gioux, S.; Choi, H.S.; Frangioni, J.V. Image-guided surgery using visible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Mol. Imaging*, 9:237-55, 2010.
- [38] Keereweer, S.; Kerrebijn, J.D.; van Driel, P.B.; Xie, B.; Kaijzel, E.L.; Snoeks, T.J.; Que, I.; Hutteman, M.; van der Vorst, J.R.; Mieog, J.S.; Vahrmeijer, A.L.; van de Velde, C.J.; Baatenburg de Jong, R.J.; Löwik, C.W. Optical image-guided surgery-where do we stand? *Mol. Imag. Biol.*, 13(2):199-207, 2011.
- [39] van der Vorst, J.R.; Schaafsma, B.E.; Hutteman, M.; Verbeek, F.P.; Liefers, G.J.; Hartgrink, H.H.; Smit, V.T.; Löwik, C.W.; van de Velde, C.J.; Frangioni, J.V.; Vahrmeijer, A.L. Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer*, 15;119(18):3411-8, 2013.
- [40] van der Vorst, J.R.; Vahrmeijer, A.L.; Hutteman, M.; Bosse, T.; Smit, V.T.; van de Velde, C.J.; Frangioni, J.V.; Bonsing, B.A. Near-infrared fluorescence imaging of a solitary fibrous tumor of the pancreas using methylene blue. *World J. Gastrointest. Surg.*, 27;4(7):180-4, 2012.
- [41] Frangioni, J.V. The problem is background, not signal. *Mol. Imaging.*, 8(6):303-4, 2009.
- [42] Kuhl, D.E.; Edwards, R.D. Image separation isotope scanning. *Radiology*, 80:653-62, 1963.
- [43] Frangioni, J.V. New technologies for human cancer imaging. *J. Clin. Oncol.*, 26(24):4012-21, 2008.
- [44] Devous, M.D.; Sr Lowe, J.L.; Payne, J.K. Dual-isotope brain SPECT imaging with technetium-99m and iodine-123: validation by phantom studies. *J. Nucl. Med.*, 33(11):2030-5, 1992.
- [45] Alford, R.; Ogawa, M.; Choyke, P.L.; Kobayashi, H. Molecular probes for the in vivo imaging of cancer. *Mol. Biosyst.*, 5(11):1279-91, 2009.

- [46] Ivashchenko, O.; van der Have, F.; Goorden, M.; Ramakers, R.; Beekman, F.J. Ultra-high-sensitivity submillimeter mouse SPECT. *J. Nucl. Med.*, 56(3):470-75, 2015.
- [47] Gotthardt, M.; Bleeker-Rovers, C.P.; Boerman, O.C.; Oyen, W.J. Imaging of inflammation by PET, conventional scintigraphy, and other imaging techniques. *J. Nucl. Med. Technol.*, 41(3):157-69, 2013.
- [48] Cassidy, P.J.; Radda, G.K. Molecular imaging perspectives. *J. R. Soc. Interface.*, 22;2(3):133-44, 2005.
- [49] Quon, A.; Gambhir, S.S. FDG-PET and beyond: molecular breast cancer imaging. *J. Clin. Oncol.*, 23:1664-73, 2005.
- [50] Jiang, L.; Tu, Y.; Shi, H.; Cheng, Z. PET probes beyond (18)F-FDG. *J. Biomed. Res.*, 28(6):435-46, 2014.
- [51] Knopman, A.A.; Wong, C.H.; Stevenson, R.J.; Homewood, J.; Mohamed, A.; Somerville, E.; Eberl, S.; Wen, L.; Fulham, M.; Bleasel, A.F. The relationship between neuropsychological functioning and FDG-PET hypometabolism in intractable mesial temporal lobe epilepsy. *Ep. Behav.*, 19(44C):136-42, 2015.
- [52] Alie, N.; Eldib, M.; Fayad, Z.A.; Mani, V. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease: PET/CT for the evaluation of atherosclerosis and inflammation. *Clin. Med. Insights Cardiol.*, 8(3):13-21, 2015.
- [53] Gallamini, A.; Zwarthoed, C.; Borra, A.. Positron emission tomography (PET) in oncology. *Cancers(Basel)*, 29;6(4):1821-89, 2014.
- [54] Delbeke, D.; Schöder, H.; Martin, W.H.; Wahl, R.L. Hybrid imaging (SPECT/CT and PET/CT): improving therapeutic decisions. *Semin. Nucl. Med.*, 39(5):308-40, 2009.
- [55] Wechalekar, K.; Sharma, B.; Cook, G. PET/CT in oncology--a major advance. *Clin. Radiol.*, 60(11):1143-55, 2005.
- [56] Chow, P.L.; Stout, D.B.; Komisopoulou, E.; Chatziioannou, A.F. A method of image registration for small animal, multi-modality imaging. *Phys. Med. Biol.*, 51(2):379-90, 2006.
- [57] Beyer, T.; Townsend DW, Brun T, Kinahan PE, Charron M, Roddy R, Jerin J, Young J, Byars L, Nutt R. A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *J. Nucl. Med.*, 41(8):1369-79, 2000.
- [58] Seibert, J.A.; Boone, J.M. X-ray imaging physics for nuclear medicine technologists. Part 2: X-ray interactions and image formation. *J. Nucl. Med. Technol.*, 33(1):3-18, 2005.
- [59] Patton, J.A.; Turkington, T.G. SPECT/CT physical principles and attenuation correction. *J. Nucl. Med. Technol.*, 36(1):1-10, 2008.
- [60] Jadvar, H.; Colletti, P.M. Competitive advantage of PET/MRI. *Eur. J. Radiol.*, 83(1):84-94, 2014

- [61] Ntziachristos, V.; Ripoll, J.; Wang, L.V.; Weissleder, R. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat. Biotechnol.*, 23:313-20, 2005.
- [62] Zacharakis, G.; Kambara, H.; Shih, H.; Ripoll, J.; Grimm, J.; Saeki, Y.; Weissleder, R.; Ntziachristos, V. Volumetric tomography of fluorescent proteins through small animals *in vivo*. *PNAS*, 102:18252-57, 2005.
- [63] Townsend, D.W. Dual-modality imaging: combining anatomy and function. *J. Nucl. Med.*, 49(6):938-55. 2008.
- [64] Chen, Z.Y.; Wang, Y.X.; Lin, Y.; Zhang, J.S.; Yang, F.; Zhou, Q.L.; Liao, Y.Y. Advance of molecular imaging technology and targeted imaging agent in imaging and therapy. *Biomed. Res. Int.*, 2014:819324, 2014.
- [65] Giron, M.C. Radiopharmaceuticals pharmacokinetics in animals: critical considerations. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 53:359-64, 2009.
- [66] Wunder, A.; Thiele, A.; Koslowski, M.; Gantner, F.; Niessen, H. Nuclear imaging to support anti-inflammatory drug discovery and development. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 58(3):290-8, 2014.
- [67] James, M.L., Gambhir, S.S. A molecular imaging primer: modalities, imaging agents, and applications. *Physiol. Rev.*, 92(2):897-965, 2012.
- [68] Chen, K.; Chen, X. Design and development of molecular imaging probes. *Curr. Top. Med. Chem.*, 10(12):1227-36, 2010.
- [69] Meares, C.F.; Moi, M.K.; Diril, H.; Kukis, D.L.; McCall, M.J.; Deshpande, S.V.; DeNardo, S.J.; Snook, D.; Epenetos, A.A. Macrocyclic chelates of radiometals for diagnosis and therapy. *Br. J. Cancer. Suppl.*, 10:21-6, 1990.
- [70] Liu, S. The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.*, 27:43-55, 2004.
- [71] Schibli, R.; Schubiger, P.A. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 29(11):1529-42, 2002.
- [72] Zhang, X.; Cabral, P.; Bates, M.; Gambini, J.P.; Fernandez, M.; Calzada, V.; Gallazzi, F.; Larimer, B.; Figueroa, S.D.; Alonso, O.; Quinn, T.P.; Balter, H.; Deutscher, S.L. *In vitro* and *in vivo* evaluation of [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-radiolabeled ErbB-2-targeting peptides for breast carcinoma imaging. *Curr. Radiopharm.*, 3:308-21, 2010.
- [73] Camacho, X.; Garcia, M.F.; Calzada, V.; Fernandez, M.; Chabalgoity, A.; Moreno, M.; Barbosa de Aguiar, R.; Alonso, O.; Gambini, J.P.; Chammas, R.; Cabral, P. [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-Radiolabeled Bevacizumab: *in vitro* and *in vivo* evaluation in melanoma model. *Oncology*, 84(4):200-9, 2013.
- [74] García, M.F.; Camacho, X.; Calzada, V.; Fernández, M.; Porcal, W.; Alonso, O.; Gambini, J.P.; Cabral, P. Synthesis of <sup>99m</sup>Tc-Nimotuzumab with tricarbonyl ion: *in vitro* and *in vivo* studies. *Curr. Radiopharm.*, 5(1):59-64, 2012.

- [75] Calzada, V.; Garcia, F; Alonso-Martínez L.M; Camacho, X; Goicochea, E.; Fernández, M.; Xiques Castillo A.; Díaz-Miqueli A; Iznaga-Escobar N; Leyva Montaña R; Alonso O.; Gambini J.P.; Cabral P. Fab(nimotuzumab)-HYNIC-<sup>99m</sup>Tc: antibody fragmentation for molecular imaging agents. En redacción.
- [76] Abrams, M.J.; Juweid, M.; TenKate, C.I.; Schwartz, D.A.; Hauser, M.M.; Gaul F.E.; Fucello, A.J.; Rubin, R.H.; Strauss, H.W.; Fischman, A.J. Technetium-99m-human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. *J. Nuc. Med.*, 31(12):2022-28, 1990.
- [77] Liu, S.; Edwards, D.S. <sup>99m</sup>Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, 8;99(9):2235-68, 1999.
- [78] Decristoforo, C.; Mather, S.J.; Cholewinski, W.; Donnemiller, E.; Riccabona, G.; Moncayo, R. <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-TOC: a new <sup>99m</sup>Tc-labelled radiopharmaceutical for imaging somatostatin receptor- positive tumours: first clinical results and intra-patient comparison with <sup>111</sup>In-labelled octreotide derivatives. *Eur. J. Nucl. Med.*, 27(9):1318-25, 2000.
- [79] Kemerink, G.J.; Liu, X.; Kieffer, D.; Ceysens, S.; Mortelmans, L.; Verbruggen, A.M.; Steinmetz, N.D.; Vanderheyden, J.L.; Green, A.M.; Verbeke, K. Safety, biodistribution, and dosimetry of <sup>99m</sup>Tc-hynic-annexin v, a novel human recombinant annexin v for human application. *J. Nucl. Med.*, 44:947-52, 2003.
- [80] Wong, E.; Kumar, V.; Howman-Giles, R.B.; Vanderheyden, J.L. Imaging of therapy-induced apoptosis using (99m)Tc-HYNICannexinV in thymoma tumor-bearing mice. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 23(6):715-26, 2008.
- [81] Laverman, P.; Dams, E.T.; Oyen, W.J.; Storm, G.; Koenders, E.B.; Prevost, R.; van der Meer, J.W.; Corstens, F.H.; Boerman, O.C. A novel method to label liposomes with <sup>99m</sup>Tc by the hydrazino nicotinyl derivative. *J. Nucl. Med.*, 40(1):192-7, 1999.
- [82] Kinne, R.W.; Emmrich, F.; Freesmeyer, M. Anti-sense oligonucleotide labeled with technetium-99m using hydrazinonicotinamide derivative and *N*-hydroxysuccinimidyl *S*-acetylmercaptoacetyltriglycine: A comparison of radiochemical behaviors and biological properties. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 54(6), 629-38, 2010.
- [83] Liu, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 60(12):1347-70, 2008.
- [84] Meszaros, L.K.; Dose, A.; Biagini, S.C.G.; Blower, P.J. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorg. Chim. Acta.*, 363(6):1059-69, 2010.

- [85] King, R.C.; Surfraz, M.B.; Biagini, S.C.; Blower, P.J.; Mather, S.J. How do HYNIC-conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. *Dalton. Trans.*, 43:4998-5007, 2007.
- [86] Babich, J.W.; Fischman, A.J. Effect of "co-ligand" on the biodistribution of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled hydrazino nicotinic acid derivatized chemotactic peptides. *Nucl. Med. Biol.*, 22(1):25-30, 1995.
- [87] Barrett, J.A.; Damphousse, D.J.; Heminway, S.J.; Liu, S.; Edwards, D.S.; Looby, R.J.; Carroll, T.R. Biological evaluation of  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled cyclic glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in the canine arteriovenous shunt and deep vein thrombosis models: effects of chelators on biological properties of  $^{99m}\text{Tc}$ chelator-peptide conjugates. *Bioconjug. Chem.*, 7(2):203-8, 1996.
- [88] Rennen, H.J.; Boerman, O.C.; Koenders, E.B.; Oyen, W.J.; Corstens, F.H. Labeling proteins with Tc-99m via hydrazinonicotinamide (HYNIC): optimization of the conjugation reaction. *Nucl. Med. Biol.*, 27(6):599-604, 2000.
- [89] Calzada, V.; Garcia, F.; Fernández, M.; Porcal, W.; Quinn, T.; Alonso, O.; Gambini, J.P.; Cabral, P. Labeling and Biological Evaluation of  $(^{99m}\text{Tc})\text{-HYNIC-Trastuzumab}$  as a potential radiopharmaceutical for *in vivo* evaluation of HER2 expression in breast cancer. *World J. Nucl. Med.*, 12(1):27-32, 2013.
- [90] Dirksen, A.; Dawson, P.E. Rapid oxime and hydrazone ligations with aromatic aldehydes for biomolecular labeling. *Bioconjug. Chem.*, 19(12):2543-48, 2008.
- [91] Surfraz, M.; Biagini, S.C.; Blower, P.J. A technetium intermediate specifically promotes deprotection of trifluoroacetyl HYNIC during radiolabelling under mild conditions. *Dalton. Trans.*, 22:2920-22, 2008.
- [92] Greenland, W.E.; Howland, K.; Hardy, J.; Fogelman, I.; Blower, P.J. Solid-phase synthesis of peptide radiopharmaceuticals using Fmoc-N-epsilon-(hynic-Boc)-lysine, a technetium-binding amino acid: application to Tc-99m-labeled salmon calcitonin. *J. Med. Chem.*, 2003, 46(9), 1751-1757.
- [93] Surfraz, M.B.; King, R.; Mather, S.J.; Biagini, S.C.G.; Blower, P.J. Trifluoroacetyl-HYNIC peptides: synthesis and  $^{99m}\text{Tc}$  radiolabeling. *J. Med. Chem.*, 50(6):1418-22, 2007.
- [94] Surfraz, M.; King, R.; Mather, S.J.; Biagini, S.C.; Blower, P.J. Trifluoroacetyl as a protecting group for HYNIC: stability in the presence of electrophiles and application in the synthesis of Tc-99m-radiolabelled peptides. *Tetrahedron*, 66(11):2037-43, 2010.
- [95] García, M.F.; Calzada, V.; Camacho, X.; Goicochea, E.; Gambini, J.P.; Quinn, T.P.; Porcal, W.; Cabral, P. Microwave-assisted synthesis of HYNIC protected analogue for  $^{99m}\text{Tc}$  labeled antibody. *Curr. Radiopharm.*, 7(2):84-90, 2014.

- [96] Calzada, V.; Camacho, X.; Zhang, F.; García, M.; Fernández, M.; Moreno, M.; Chabalgoity, A.; Deutscher, S.; Gallazzi, F.; Gambini, J.P.; Cabral, P.; Quinn, T.P.  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-KCCYSL *in vivo* imaging for Her2 status. En redacción.
- [97] Liu, S. Edwards DS. Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiopharmaceuticals. *Bioconjug. Chem.*, 12(1):7-34, 2001.
- [98] Clarke, E.T.; Martell, A.E. Stabilities of trivalent metal ion complexes of the tetraacetate derivatives of 12-, 13- and 14-membered tetraazamacrocycles *Inorg. Chim. Acta.*, 190(1):37-4, 1991.
- [99] Byegard, J.; Skarnemark, G.; Skhlberg, M. The stability of some metal EDTA, DTPA and DOTA complexes: Application as tracers in groundwater studies *J. Rad. Nucl. Chem.*, 241(2):281-90, 1999.
- [100] Marques, M.P.; Garakdes, C.F; Sherry, A.D.; Merbach, A.E.; Powell, H.; Pubanz, D.; Aime, S.; Botta, M. NMR conformational study of the lanthanide(III) complexes of DOTA in aqueous solution. *J. Alloy Compd.*, 225(1-2)303-307, 1995.
- [101] Al-Ejeh, F.; Darby, J.M.; Brown, M. P. *In vivo* targeting of dead tumor cells in a murine tumor model using a monoclonal antibody specific for the Ia autoantigen. *Clin. Cancer Res.*, 13:5519-27. 2007.
- [102] Lewis, M.R.; Kao, J.Y.; Anderson, A.L.; Shively, J.E.; Raubitschek, A. An improved method for conjugating monoclonal antibodies with *N*-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA, *Bioconj. Chem.*, 2001:320-24, 2001.
- [103] Agdeppa, E.D.; Spilker, M.E. A review of imaging agent development. *AAPS J.*, 11(2):286-99, 2009.
- [104] Gold, L.; Polisky, B.; Uhlenbeck, O.; Yarus, M. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.*, 64:763-97, 1995.
- [105] Famulok, M.; Mayer, G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 243:123-36, 1999.
- [106] Hicke, B.J.; Stephens, AW.; Gould, T; Chang, Y.F.; Lynott, C.K.; Heil, J.; Borkowski, S.; Hilger, C.; Cook, G.; Warren, S.; Schmidt, P.G. Tumor targeting by an aptamer. *J. Nucl. Med.*, 47:668-78, 2006.
- [107] Osborne, S.E.; Ellington, A.D. Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry. *Chem. Rev.*, 97(2):349-370, 1997.
- [108] Breaker, R.R. Natural and engineered nucleic acids as tools to explore biology. *Nature*, 432:838-45, 2004
- [109] Spiegelman, S.; Haruna, I.; Holland, B.; Beaudreau, G.; Mills, D. The synthesis of a self-propagating and infectious nucleic acid with purified enzyme. *Biochem.*, 54:919-26, 1995.

- [110] Ellington, A.; Szostak, J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346:818-22, 1990.
- [111] Tuerk, C.; Gold, L. systematic evolution of ligands by exponential enrichment: ARN ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249:505-10, 1990.
- [112] Kimoto, M.; Yamashige, R.; Matsunaga, K.; Yokoyama, S.; Hirao, I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat. Biotechnol.*, 31(5):453-57, 2013.
- [113] Shangguan, D.; Li, Y.; Tang, Z.; Cao, Z.C.; Chen, H.; Mallikaratchy, P.; Sefah, K.; Yang, C.J.; Tan, W. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *PNAS*, 103(32):11838-43, 2006.
- [114] Shangguan, D.; Cao, Z.; Meng, L.; Mallikaratchy, P.; Sefah, K.; Wang, H.; Li, Y.; Tan, W. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *Proteome Res.*, 7(5):2133-9, 2008.
- [115] Meyer, M.; Scheper, T.; Walter, J.G. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97(16):7097-109, 2013.
- [116] Jayasena, D.S. Aptamers: An emerging class of molecular that rival antibodies in diagnosis. *Clin. Chem.*, 45(9):1628-50, 1999.
- [117] Borbas, K.E.; Ferreira, C.S.; Perkins, A.; Bruce, J.I.; Missailidis, S. Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer. *Bioconjug. Chem.*, 18(4):1205-12, 2007.
- [118] Li, W.; Yang, X.; Wang, K.; Tan, W.; He, Y.; Guo, Q.; Tang, H.; Liu, J. Real-time imaging of protein internalization using aptámero conjugates. *Anal. Chem.*, 80(13):5002-8, 2008.
- [119] Zhang, K.; Sefah, K.; Tang, L.; Zhao, Z.; Zhu, G.; Ye, M.; Sun, W.; Goodison, S.; Tan, W. A novel aptamer developed for breast cancer cell internalization. *Chem. Med. Chem.*, 7(1):79-84, 2012.
- [120] Gryziewicz, L. Regulatory aspects of drug approval for macular degeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57(14):2092-8, 2005
- [121] Rosenberg, J.E.; Bambury, R.M.; Van Allen, E.M.; Drabkin, H.A.; Lara, P.N.; Jr Harzstark, A.L.; Wagle, N.; Figlin, R.A.; Smith, G.W.; Garraway, L.A.; Choueiri, T.; Erlandsson, F.; Laber, D.A. A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma. *Invest. New Drugs.*, 32(1):178-87, 2014.
- [122] Vavalle, J.P.; Rusconi, C.P.; Zelenkofske, S.; Wargin, W.A.; Ortel, T.L.; Alexander, J.H.; Povsic, T.J.; Becker, R.C. The effect of the REG2 anticoagulation system on thrombin generation kinetics: a pharmacodynamic and pharmacokinetic first-in-human study. *J. Thromb.*, 38(3):275-84, 2014.



- [123] Hwang do, W.; Ko, H.Y.; Lee, J.H.; Kang, H.; Ryu, S.H.; Song, I.C.; Lee, D.S.; Kim, S. A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer. *J Nucl Med.*, 51(1):98-105, 2010.
- [124] Charlton, J.; Sennello, J.; Smith, D. *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem. Biol.*, 4(11):809-16, 1997.
- [125] Tong, R.; Coyle, V.; Tang, L.; Barger, A.; Fan, T.; Cheng, J. Polylactide nanoparticles containing stably incorporated cyanine dyes for *in vitro* and *in vivo* imaging applications. *Microsc. Res. Tech.*, 73:901-09, 2010.
- [126] Farokhzad, O.; Cheng, J.; Teply, B.; Sherifi, I.; Jon, S.; Kant-off, P.; Richie, J.; Langer, R. Targeted nanoparticle- aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *PNAS*, 103:6315-20, 2006.
- [127] Shi, H.; Tang, Z.; Kim, Y.; Nie, H.; Huang, Y.; He, X.; Deng, K.; Wang, K.; Tan, W. *In vivo* fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by Cell-SELEX. *Chem. Asian J.*, 5:2209-13, 2010.
- [128] Jalalian, S.H.; Taghdisi, S.M.; Shahidi Hamedani, N.; Kalat, S.A.; Lavaee, P.; Zandkarimi, M.; Ghows, N.; Jaafari, M.R.; Naghibi, S.; Danesh, N.M.; Ramezani, M.; Abnous, K. Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 50(2):191-97, 2013.
- [129] Kim, D.; Jeong, Y.; Jon, S. A drug-loaded aptamer-gold nanoparticle bioconjugate for combined CT imaging and therapy of prostate cancer. *ACS Nano*, 4:3689-96, 2010.
- [129] Tavitian, B. *In vivo* imaging with oligonucleotides for diagnosis and drug development. *Gut*, 52(4):40-47, 2003.
- [130] Lucignani, G. Aptamers and *in-beam* PET for advanced diagnosis and therapy optimisation. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.*, 33:1095-97, 2006.
- [131] Lendvai, G.; Estrada, S.; Bergstrom, M. Radiolabelled oligonucleotides for imaging of gene expression with PET. *Curr. Med. Chem.*, 16:4445-61, 2009.
- [132] Dougan, H.; Lyster, D.M.; Vo, C.V.; Stafford, A.; Weitz, J.I.; Hobbs, J. Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl Med Biol.*, 27(3):289-97, 2000.
- [133] Schmidt, K.S.; Borkowski, S.; Kurreck, J.; Stephens, A.W.; Bald, R.; Hecht, M.; Friebe, M.; Dinkelborg, L.; Erdmann, V.A. Application of locked nucleic acids to improve aptamers *in vivo* stability and targeting function. *Nucleic Acids Res.*, 32(19):5757-65, 2004.
- [134] Hicke, B.; Stephens, A.; Gould, T.; Chang, Y.; Lynott, C.; Heil, J.; Borkowski, S.; Hilger, C.; Cook, G.; Warren, S. Tumor targeting by an aptamer. *J. Nucl. Med.*, 47:668-78, 2006.

- [135] Da Pieve, C.; Perkins, A.C.; Missailidis, S. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with (99m)Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice. *Nucl. Med. Biol.*, 36(6):703-10, 2009.
- [136] Shi, H.; Tang, Z.; Kim, Y.; Nie, H.; Huang, Y.F.; He, X.; Deng, K.; Wang, K.; Tan, W. *In vivo* fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-SELEX. *Chem. Asian J.*, 5(10):2209-13, 2010.
- [137] Shi, H.; He, X.; Wang, K.; Wu, X.; Ye, X.; Guo, Q.; Tan, W.; Qing, Z.; Yang, X.; Zhou, B. Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *PNAS.*, 108(10):3900-05, 2011.
- [138] Rockey, W.M.; Huange, L.; Klopping, K.C.; Baumhoerb, N.J.; Giangrande, P.H.; Schultz, M.K. Synthesis and radiolabeling of chelator-RNA aptamer bioconjugates with copper-64 for targeted molecular imaging. *Bioorg. Med. Chem.*, 19:4080-90, 2011.
- [139] Da Rocha, S.; Da Rocha Gomes, S.; Miguel, J.; Azéma, L.; Eimer, S.; Ries, C.; Dausse, E.; Loiseau, H.; Allard, M.; Toulmé, J.J. (99m)Tc-MAG3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloprotease-9. *Bioconjug. Chem.*, 23(11):2192-200, 2012.
- [140] Shi, H.; Cui, W.; He, X.; Guo, Q.; Wang, K.; Ye, X.; Tang, J. Whole cell-SELEX aptamers for highly specific fluorescence molecular imaging of carcinomas *in vivo*. *PLoS One*, 8(8):e70476, 2013.
- [141] Dassie, J.P.; Hernandez, L.I.; Thomas, G.S.; Long, M.E.; Rockey, W.M.; Howell, C.A.; Chen, Y.; Hernandez, F.J.; Liu, X.Y.; Wilson, M.E.; Allen, L.; Vaena, D.A.; Meyerholz, D.K.; Giangrande, P.H. Targeted inhibition of prostate cancer metastases with an RNA aptamer to prostate specific membrane antigen (PSMA). *Mol. Ther.*, 22(11):1910-22, 2014.
- [142] Correa, C.R.; de Barros, A.L.; Ferreira, A.; de Goes, A.M.; Cardoso, V.N.; de Andrade, A.S. Aptamers directly radiolabeled with technetium-99m as a potential agent capable of identifying carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor cells T84. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24(8):1998-2001, 2014.
- [143] Wu, X.; Liang, H.; Tan, Y.; Yuan, C.; Li, S.; Li, X.; Li, G.; Shi, Y.; Zhang, X. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma *in vivo*. *PLoS One*, 9(6):e90752, 2014.
- [144] Zeng, Z.; Parekh, P.; Li, Z.; Shi, Z.Z.; Tung, C.H.; Zu, Y. Specific and sensitive tumor imaging using biostable oligonucleotide aptamer probes. *Theranostics*, 4(9):945-52, 2014.

- [145] Cao, H.Y.; Yuan, A.H.; Chen, W.; Shi, X.S.; Miao, Y. A DNA aptámero with high affinity and specificity for molecular recognition and targeting therapy of gastric cancer. *BMC Cancer*, 14:699, 2014.
- [146] Li, J.; Zheng, H.; Bates, P.J.; Malik, T.; Li, X.F.; Trent, J.O.; Ng, C.K. Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: preliminary assessment in lung cancer. *Nucl. Med. Biol.*, 41(2):179-85, 2014.
- [147] Varmira, K.; Hosseinimehr, S.J.; Noaparast, Z.; Abedi, S.M. A HER2-targeted RNA aptamer molecule labeled with <sup>99m</sup>Tc for single-photon imaging in malignant tumor. *Nucl. Med. Biol.*, 40(8):980-6, 2013.
- [148] Varmira, K.; Hosseinimehr, S.J.; Noaparast, Z.; Abedi, S.M. An improved radiolabelled RNA aptamer molecule for HER2 imaging in cancers. *J. Drug Target.*, 22(2):116-22, 2014.
- [149] Da Pieve, C.; Blackshaw, E.; Missailidis, S.; Perkins, A.C. PEGylation and biodistribution of an anti-MUC1 aptamer in MCF-7 tumor-bearing mice. *Bioconjug. Chem.*, 23(7):1377-81, 2012.
- [150] Reyderman, L.; Stavchansky, S. Pharmacokinetics and biodistribution of a nucleotide-based thrombin inhibitor in rats. *Pharm. Res.*, 15(6):904-10, 1998.
- [151] Keefe, A.D.; Cload, S.T. SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12(4):448-56, 2008.
- [152] Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.*, 24(4):381-403, 2007.
- [153] Hagiwara, K.; Fujita, H.; Kasahara, Y.; Irisawa, Y.; Obika, S.; Kuwahara, M. *In vitro* selection of DNA-based aptamers that exhibit RNA-like conformations using a chimeric oligonucleotide library that contains two different xeno-nucleic acids. *Mol. Biosyst.*, 11(1):71-6, 2015.
- [154] Scheibe, C.; Wedepohl, S.; Riese, S.B.; Dervedde, J.; Seitz, O. Carbohydrate-PNA and aptamer-PNA conjugates for the spatial screening of lectins and lectin assemblies. *Chem. BioChem.*, 14(2):236-50, 2013.
- [155] Kimoto, M.; Yamashige, R.; Yokoyama, S.; Hirao, I. PCR amplification and transcription for site-specific labeling of large RNA molecules by a two-unnatural-base-pair system. *J. Nucleic Acids*, 2012:230943, 2012.
- [156] Chen, Y.; O'Donoghue, M.B.; Huang, Y. F.; Huang, Y.F.; Kang, H.; Phillips, J.A.; Chen, X.; Estevez, M.C.; Tan, W. A surface energy transfer nanoruler for measuring binding site distances on live cell surfaces. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(46):16559-70, 2010.
- [157] Xiao, Z., Shanguan, D.; Cao, Z.; Fang, X.; Tan, W. Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chem. Eur. J.*, 14(6):1769-75, 2008.

- [158] Shangguan, D.; Tang, Z.; Mallikaratchy, P.; Xiao, Z.; Tan, W. Optimization and modifications of aptamers selected from live cancer cell lines. *Chem. Biochem.*, 8(6):603-6, 2007.
- [159] Huang, Y.F.; Shangguan, D.; Liu, H.; Phillips, J.A.; Zhang, X.; Chen, Y.; Tan, W. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *Chem. Biochem.*, 10(5):862-8, 2009.
- [160] Grassot, J.; Gouy, M.; Perrière, G.; Mouchiroud, G. Origin and molecular evolution of receptor tyrosine kinases with immunoglobulin-like domains. *Mol. Biol. Evol.*, 23(6):1232-41, 2006.
- [161] Lapraz, F.; Röttinger, E.; Duboc, V.; Range, R.; Duloquin, L.; Walton, K.; Wu, S.Y.; Bradham, C.; Loza, M.; Hibino, T.; Wilson, K.; Poustka, A.; McClay, D.; Angerer, L.; Gache, C.; Lepage, T. RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev. Biol.*, 300(1):132-52, 2006.
- [162] Kroiher, M.; Miller, M. A.; Steele, R. E. Deceiving appearances: signaling by 'dead' and 'fractured' receptor protein-tyrosine kinases. *BioEssays*, 23:69-76, 2001.
- [163] Park, S.K.; Lee, H.S.; Lee, S.T. Characterization of the human full-length PTK7 cDNA encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule closely related to chick KLG. *J. Biochem.*, 119:235-39, 1996.
- [164] Jung, J.W.; Ji, A.R.; Lee, J.; Kim, U.J.; Lee, S.T. Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA. *BBA.*, 1579:153-63, 2002.
- [165] Boudeau, J.; Miranda-Saavedra, D.; Barton, G.J.; Alessi, D.R. Emerging roles of pseudokinases. *Trends. Cell Biol.*, 16:443-52, 2006.
- [166] Lu, X.; Borchers, A.G.; Jolicœur, C.; Rayburn, H.; Baker, J.C.; Tessier-Lavigne, M. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature*, 430:93-98, 2004.
- [167] Shnitsar, I.; Borchers, A. PTK7 recruits dsh to regulate neural crest migration. *Development*, 135:4015-24, 2008.
- [168] Peradziryi, H.; Tolwinski, N.S.; Borchers, A. The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch. Biochem. Biophys.*, 524(1):71-6, 2012.
- [169] Peradziryi, H.; Kaplan, N.A.; Podleschny, M.; Liu, X.; Wehner, P.; Borchers, A.; Tolwinski, N.S. PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling. *EMBO J.*, 30(18):3729-40, 2011.
- [170] Wagner, G.; Peradziryi, H.; Wehner, P.; Borchers, A.; PlexinA1 interacts with PTK7 and is required for neural crest migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 402(2):402-7, 2010.

- [171] Golubkov, V.S.; Strongin, A.Y. Insights into ectodomain shedding and processing of protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7). *J. Biol. Chem.*, 287(50):42009-18, 2012.
- [172] Shin, W.S.; Maeng, Y.S.; Jung, J.W.; Min, J.K.; Kwon, Y.G.; Lee, S.T. Soluble PTK7 inhibits tube formation, migration, and invasion of endothelial cells and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371(4):793-8, 2008.
- [173] Prebet, T.; Lhoumeau, A.C.; Arnoulet, C.; Aulas, A.; Marchetto, S.; Audebert, S.; Puppo, F.; Chabannon, C.; Sainty, D.; Santoni, M.J.; Sebbagh, M.; Summerour, V.; Huon, Y.; Shin, W.S.; Lee, S.T.; Esterni, B.; Vey, N.; Borg, J.P. The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. *Blood.*, 116(13):2315-23, 2010.
- [174] Banga, S.S.; Ozer, H.L.; Park, S.K.; Lee, S.T. Assignment of PTK7 encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule to human chromosome 6p21.1-->p12.2 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.*, 76(1-2):43-4, 1997.
- [175] Mossie, K.; Jallal, B.; Alves, F.; Sures, I.; Plowman, G.D.; Ullrich, A. Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 11(10):2179-84, 1995.
- [176] Saha, S.; Bardelli, A.; Buckhaults, P.; Velculescu, V.E.; Rago, C.; St Croix, B.; Romans, K.E.; Choti, M.A.; Lengauer, C.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science*, 294:1343-6, 2001.
- [177] Lin, Y.; Zhang, L.H.; Wang, X.H.; Xing, X.F.; Cheng, X.J.; Dong, B.; Hu, Y.; Du, H.; Li, Y.A.; Zhu, Y.B.; Ding, N.; Du, Y.X.; Li, J.Y.; Ji, J.F. PTK7 as a novel marker for favorable gastric cancer patient survival. *J. Surg. Oncol.*, 106(7):880-6, 2012.
- [178] Endoh, H.; Tomida, S.; Yatabe, Y.; Konishi, H.; Osada, H.; Tajima, K.; Kuwano, H.; Takahashi, T.; Mitsudomi, T. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Oncol.*, 22(5):811-9, 2004.
- [179] Zhang, H.; Wang, A.; Qi, S.; Cheng, S.; Yao, B.; Xu, Y. Protein tyrosine kinase 7 (PTK7) as a predictor of lymph node metastases and a novel prognostic biomarker in patients with prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, 15(7):11665-77, 2014.
- [180] Fazilaty, H.; Mehdipour, P. Genetics of breast cancer bone metastasis: a sequential multistep pattern. *Clin. Exp. Metastasis*. 31(5):595-12, 2014.
- [181] Gärtner, S.; Gunesch, A.; Knyazeva, T.; Wolf, P.; Högel, B.; Eiermann, W.; Ullrich, A.; Knyazev, P.; Ataseven, B. PTK 7 is a transforming gene and prognostic marker for breast cancer and nodal metastasis involvement. *PLoS One*, 9(1):e84472, 2014.

- [182] Meng, L.; Sefah, K.; O'Donoghue, M.B.; Zhu, G.; Shanguan, D.; Noorali, A.; Chen, Y.; Zhou, L.; Tan, W. Silencing of PTK7 in colon cancer cells: caspase-10-dependent apoptosis via mitochondrial pathway. *PLoS One*, 5(11):e14018, 2010.
- [183] Kobus F,J.; Fleming, K.G. The GxxxG-containing transmembrane domain of the CCK4 oncogene does not encode preferential self-interactions. *Biochem.*, 44: 1464-70, 2005.
- [184] Puppo, F.; Thome, V.; Lhoumeau, A.C.; Cibois, M.; Gangarw, A.; Lembo F.; Belotti, E.; Marchetto, S.; Lecine,P.; Prebet T.; Sebbagh, M.; Shin, W.S.; Lee S.T.; Kodjabachian, L.; Borg, J.P. Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/b-catenin canonical signalling. *EMBO reports*, 2(1):43, 2011.
- [185] Golubkov, V.S.; Chekanov, A.V.; Cieplak, P.; Aleshin, A.E.; Chernov, A.V.; Zhu, W.; Radichev, I.A.; Zhang, D.; Dong, P.D.; Strongin, A.Y. The Wnt/planar cell polarity protein-tyrosine kinase-7 (PTK7) is a highly efficient proteolytic target of membrane type-1 matrix metalloproteinase: implications in cancer and embryogenesis. *J. Biol Chem.*, 285(46):35740-9, 2010.
- [186] Golubkov, V.S.; Prigozhina, N.L.; Zhang, Y.; Stoletov, K.; Lewis, J.D.; Schwartz, P.E.; Hoffman, R.M.; Strongin, A.Y. Protein-tyrosine pseudokinase 7 (PTK7) directs cancer cell motility and metastasis. *J. Biol. Chem.*, 289(35):24238-49, 2014.
- [187] Itoh, Y. MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life*, 58(10):589-96, 2006.
- [188] Shin, W.S.; Maeng, Y.S.; Jung, J.W.; Min, J.K.; Kwon, Y.G.; Lee, S.T. Soluble PTK7 inhibits tube formation, migration, and invasion of endothelial cells and angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371(4):793-8, 2008.
- [189] Lee, H.K.; Chauhan, S.K.; Kay, E.; Dana, R. Flt-1 regulates vascular endothelial cell migration via a protein tyrosine kinase-7-dependent pathway. *Blood*,117(21):5762-71, 2011.
- [190] Jung, J.W.; Ji, A.R.; Lee, J.; Kim, U.J.; Lee, S.T. Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternativesplicing of its mRNA. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1579(2-3):153-63, 2002.
- [191] Prebet ,T.; Lhoumeau, A.C.; Arnoulet, C.; Aulas, A.; Marchetto, S.; Audebert, S.; Puppo, F.; Chabannon, C.; Sainty, D.; Santoni, M.J.; Sebbagh, M.; Summerour, V.; Huon, Y.; Shin, W.S.; Lee, S.T.; Esterni, B.; Vey, N.; Borg, J.P. The cell polarity PTK7 receptor acts as a modulator of the chemotherapeutic response in acute myeloid leukemia and impairs clinical outcome. *Blood*,116(13):2315-23, 2010.
- [192] Jiang, G.; Zhang, M.; Yue, B.; Yang, M.; Carter, C.; Al-Quran, S.Z.; Li, B.; Li, Y. PTK7: a new biomarker for immunophenotypic characterization of maturing T cells and T cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, 36(11):1347-53, 2012.

[193] Patil, S.D.; Rhodes, D.G.; Burgess, D.J. DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *AAPS*, 7(1):61-7, 2005.

[194] Pysz, M.A; Gambhira, S.S.; Willmanna, J.K. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin. Radiol.*, 65(7):500-16, 2010.

## **10. AGRADECIMIENTOS**



Quiero agradecer muy especialmente a todas las personas que de alguna forma colaboraron en todo este tiempo para hacer que este trabajo fuese posible:

A mis tutores de tesis Dr. Hugo Cerecetto, Dr. Pablo Cabral y Dr. Thomas Quinn por su orientación y dedicación.

A la Dra. Maria Moreno, el Dr. Alejandro Chabalgoty y la MSc. Jessica Newton por apoyarme en la realización de los estudios en células.

A la MSc. Maria Fernanda García por realizar la síntesis de NHS-HYNIC(Tfa).

Al Br. Marcelo Fernandez y al Br. Joel Gonzalez, por los estudios en animales.

Al Dr. Manuel Ibarra por la colaboración en el análisis farmacocinético.

Al Dr. Omar Alonso y Dr. Juan Pablo Gambini por facilitar la actividad.

A la Dra. Deborah Keszenman por su asesoramiento en el trabajo con oligonucleótidos.

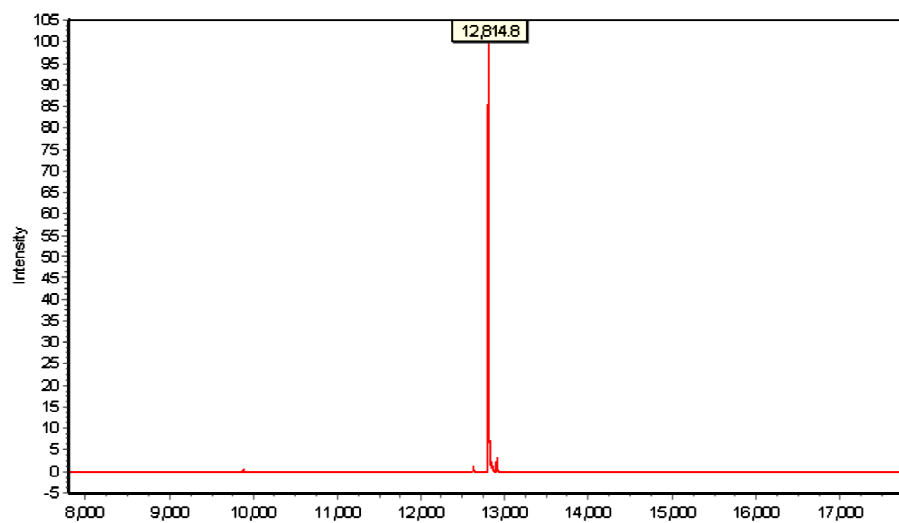
A la Msc. Natalia Oddone y Dra. Silvia Villar por la colaboración en microscopia.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por haberme otorgarme una beca de doctorado y financiarme el proyecto a través del Fondo Clemente Estable. También a PEDECIBA Química por financiar varias actividades y una pasantía.

Finalmente a todos mis compañeros de trabajo, familia y amigos que me acompañaron todo este tiempo.



## **11. ANEXO**



Calculated Molecular Weight: 12,813.4  
 Measured Molecular Weight: 12,814.8

Sequence Name: APTAMER-1.2  
 Oligo Sequence: 5'- /5AmMC6/ATC TAA CTG CTG CGC CGC CGG GAA AAT ACT  
 GTA CGG TTA GA -3'

Sample Designation	Approximate Concentration	Expected MW (Neutral, Average, Da)
4) "Aptamer"	160 µg/40 µL	12813

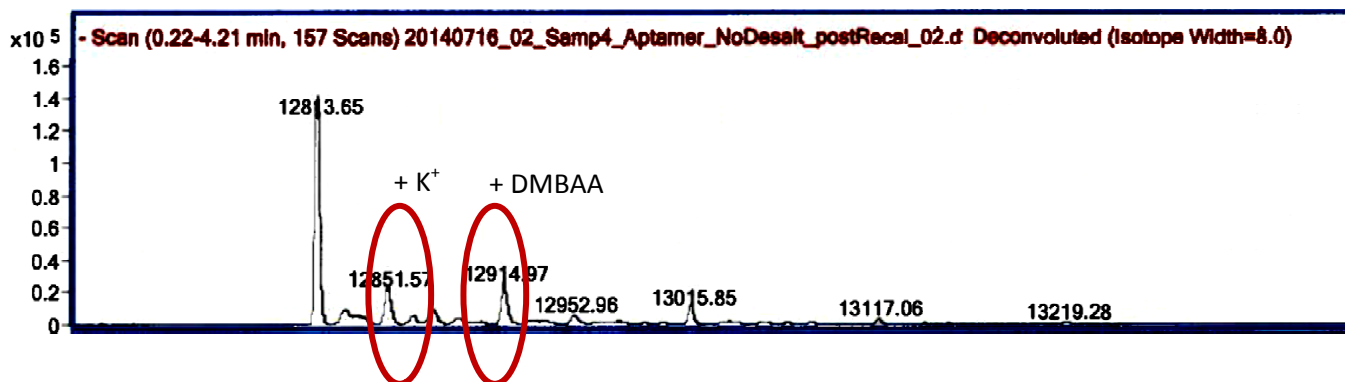
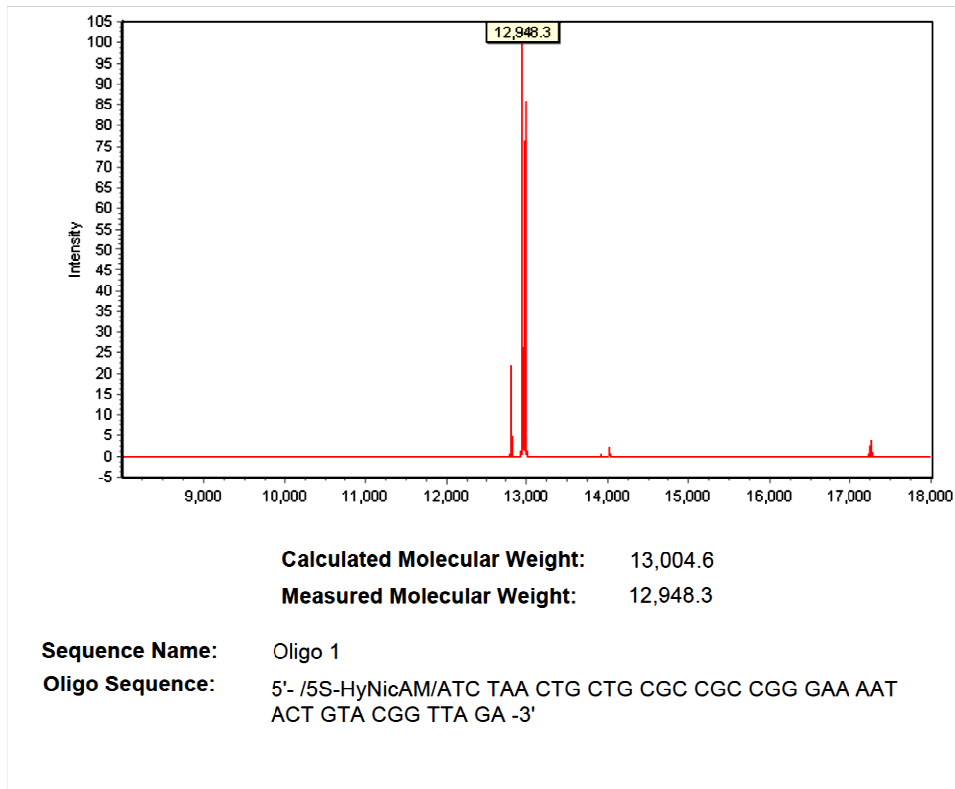
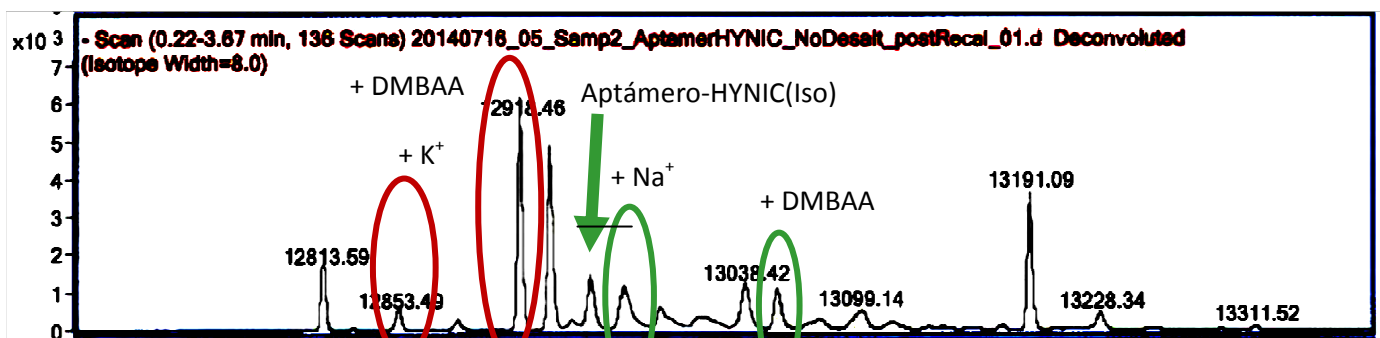


Figura A1. Espectro de masas de Sgc8-c-NH<sub>2</sub>. Arriba: espectro de masas suministrado por el comerciante; Abajo: espectro de masas obtenido en la presente tesis.



Sample Designation	Approximate Concentration	Expected MW (Neutral, Average, Da)
2) "Aptamer"-HYNIC	60 µg/40 µL	13005



En rojo: Sgc8-c-NH<sub>2</sub>  
 En verde: Sgc8-c-HYNIC(Iso)

Figura A2. Espectro de masas de Sgc8-c-HYNIC(Iso). Arriba: espectro de masas suministrado por el comerciante; Abajo: espectro de masas obtenido en la presente tesis.

Sample Designation	Approximate Concentration	Expected MW (Neutral, Average, Da)
1) "Aptamer"-HYNIC-TFA	60 µg/20 µL	13045

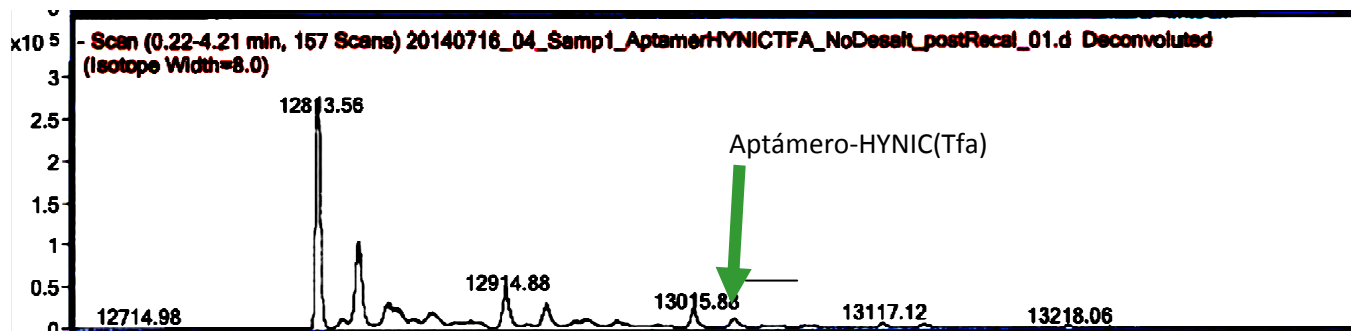


Figura A3. Espectro de masas de Sgc8-c-HYNIC(Tfa) obtenido en la presente tesis.

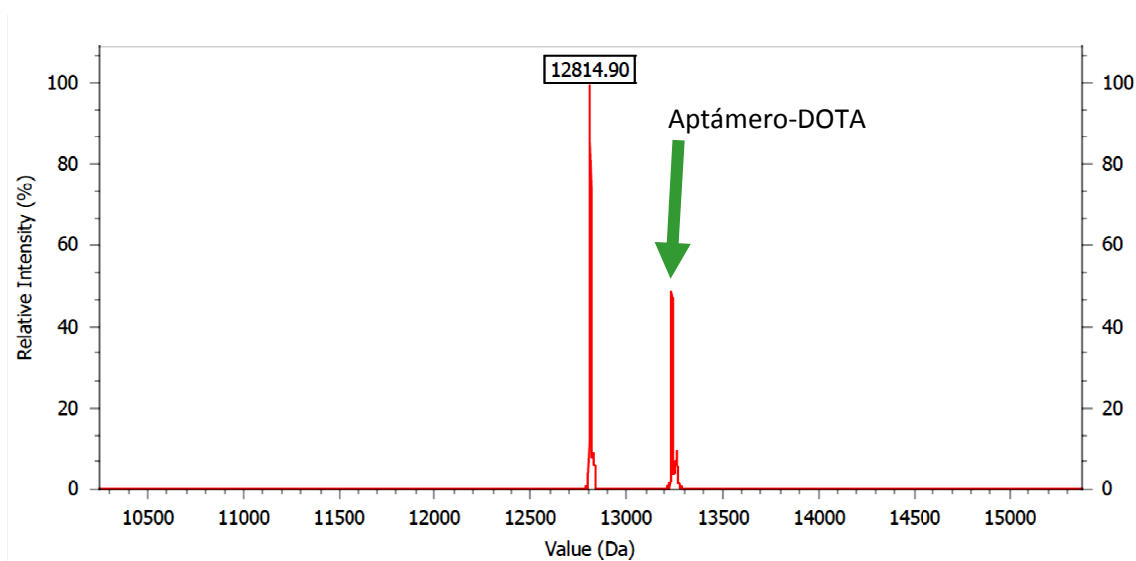


Figura A4. Espectro de masas de Sgc8-c-DOTA obtenido en la presente tesis.