



Facultad de Ciencias - Universidad de la República  
Centro de Investigaciones Nucleares  
Área Radiofarmacia

**$^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab (Nimotuzumab) como potencial agente de imagen  
molecular en tumores con sobreexpresión de EGFR**

Enzo Javier Goicochea Silva

**Tutores:** Dr. Omar Alonso, MSc. Victoria Calzada

Montevideo, Uruguay

2013

## ÍNDICE

<b>I</b>	<b>Resumen</b> .....	4
<b>II</b>	<b>Introducción</b> .....	6
	<b>2.1. Cáncer</b> .....	7
	2.1.1. Causas.....	8
	2.1.2. Incidencia y mortalidad.....	8
	<b>2.2. Cáncer de mama</b> .....	10
	2.2.1. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria.....	10
	2.2.2. Tipos de carcinoma mamario.....	11
	2.2.3. Causas.....	14
	2.2.4. Factores de riesgo.....	14
	2.2.5. Pronóstico.....	15
	<b>2.3. Receptores del factor de crecimiento epidérmico</b> .....	15
	2.3.1. Ligandos de la familia HER.....	17
	2.3.2. Dimerización y activación de los receptores HER.....	19
	2.3.3. EGFRs en la biología tumoral.....	20
	2.3.4. EGFR/HER1 como blanco tumoral.....	21
	<b>2.4. Anticuerpos</b> .....	22
	2.4.1. Anticuerpos monoclonales.....	23
	2.4.2. CIMAher®Nimotuzumab.....	24
	<b>2.5. Imagenología y Cáncer</b> .....	25
	<b>2.6. Radiofármacos</b> .....	27
	2.6.1. Radiofármacos para diagnóstico.....	28
	2.6.2. Química del <sup>99m</sup> Tc y sus usos.....	29
	2.6.3. Algunas estrategias.....	31
	2.6.4. Estrategias de marcado.....	34
	2.6.5. Quelantes Bifuncionales y HYNIC.....	35
<b>III</b>	<b>Materiales y Procedimiento</b> .....	39
	<b>3.1. Obtención y Purificación del hR3</b> .....	40
	<b>3.2. Digestión del hR3, purificación y controles de calidad</b> .....	40
	<b>3.3. Derivatización y purificación de ambos conjugados</b> .....	41
	<b>3.4. Marcación con <sup>99m</sup>Tc del conjugado HYNIC-hR3/HYNIC-Fab</b> .....	42

	<b>3.5.</b>	Controles.....	44
	<b>3.6.</b>	Estabilidad del mercado.....	45
	<b>3.7.</b>	Estabilidad de los conjugados S-HYNIC-hR3/TFA-HYNIC-hR3.....	45
	<b>3.8.</b>	Estudios de Biodistribución.....	45
<b>IV</b>	<b>Resultados</b> .....		46
	<b>4.1.</b>	Obtención y Purificación.....	47
	<b>4.2.</b>	Digestión del hR3, purificación y control de calidad.....	47
	<b>4.3.</b>	Derivatización y purificación de ambos conjugados.....	49
	<b>4.4.</b>	Marcación con <sup>99m</sup> Tc del conjugado HYNIC- hR3/HYNIC-Fab....	49
	<b>4.5.</b>	Estabilidad del marcado.....	50
	<b>4.6.</b>	Estabilidad de los conjugados HYNIC- hR3/HYNIC-Fab.....	52
	<b>4.7.</b>	Biodistribuciones.....	52
<b>V</b>	<b>Discusión</b> .....		56
<b>VI</b>	<b>Conclusión</b> .....		59
<b>VII</b>	<b>Bibliografía</b> .....		61
<b>VIII</b>	<b>Agradecimientos</b> .....		71
<b>IX</b>	<b>Anexos</b> .....		73

# I. Resumen

La investigación y desarrollo de nuevos radiofármacos de diagnóstico dirigidos contra dianas moleculares es de gran relevancia para caracterizar la presencia de tumores y lograr mejores estrategias terapéuticas. Los tumores, y especialmente el tumor de mama, se caracterizan por la sobreexpresión de diferentes tipos de receptores. En el caso del cáncer de mama, cabeza y cuello se sobreexpresa el receptor HER1 (ErbB-1) perteneciente a la familia de los receptores para factores de crecimiento epidérmico (EGFR). El HER1 es uno de los receptores más ampliamente estudiados y está relacionado directamente con el crecimiento, diferenciación y reparación de daño celular. En el cáncer de mama su expresión se encuentra desregulada, asociándose directamente con el proceso de tumorigénesis.

El empleo de anticuerpos monoclonales (mAB) humanizados dirigidos contra dianas moleculares sobreexpresadas como los EGFRs ha generado el desarrollo de estrategias moleculares para obtener imágenes centellográficas. CIMAher<sup>®</sup> Nimotuzumab (hR3) es un anticuerpo monoclonal humanizado capaz de reconocer específicamente el receptor HER1 y unirse con gran afinidad a su dominio extracelular.

Gracias al enorme potencial para detectar y caracterizar tumores en los primeros estadios de su desarrollo, así como orientar la mejor estrategia de tratamiento para el paciente que posee la imagenología molecular *in vivo*, se ha utilizado con gran interés para el diagnóstico de diferentes tipos de procesos cancerosos.

El objetivo del trabajo es la obtención y marcado con <sup>99m</sup>Tc del anticuerpo hR3 y de su fragmento Fab para su potencial empleo como agente de imagen molecular en tumores con sobreexpresión de HER1. Se propuso evaluar también las ventajas para la marcación y mejoramiento de la estabilidad de los conjugados, comparando dos diferentes derivados del agente quelante bifuncional HYNIC, en la actualidad altamente utilizado para marcar biomoléculas.

## **II. Introducción**

## 2.1. Cáncer

El cáncer es una patología de base genética que se caracteriza por la progresiva acumulación de mutaciones no letales tanto heredadas como esporádicas, lo que determina que las células adquieran una serie de alteraciones relacionadas principalmente con la regulación del ciclo celular [1].

La pérdida de control del ciclo celular es un proceso multifactorial, que tiene como consecuencia el crecimiento celular autónomo (ver figura 1), evasión de la apoptosis, inmortalidad, capacidad para generar nuevos vasos sanguíneos e invadir nuevos tejidos [2]. Las células cancerosas al diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y/o por el sistema linfático generan metástasis en sitios alejados del tumor primario [3].

Los diferentes cánceres se pueden clasificar en 6 tipos teniendo en cuenta el tejido y el tipo celular de origen. Se denomina *Carcinoma* al tumor que se origina en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos. Si se genera en el hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén es llamado *Sarcoma*, en cambio, si el origen es en el tejido que forma la sangre, como la médula ósea, generando una sobreproducción de células sanguíneas anormales se llaman *Leucemias*. Otro tipo de tumor es aquel que se desarrolla en las células del sistema inmunitario llamado *Linfoma-Mieloma*, y por último, los que se generan en células del cerebro y de la médula espinal son llamados *Cánceres del Sistema Nervioso Central* [4].

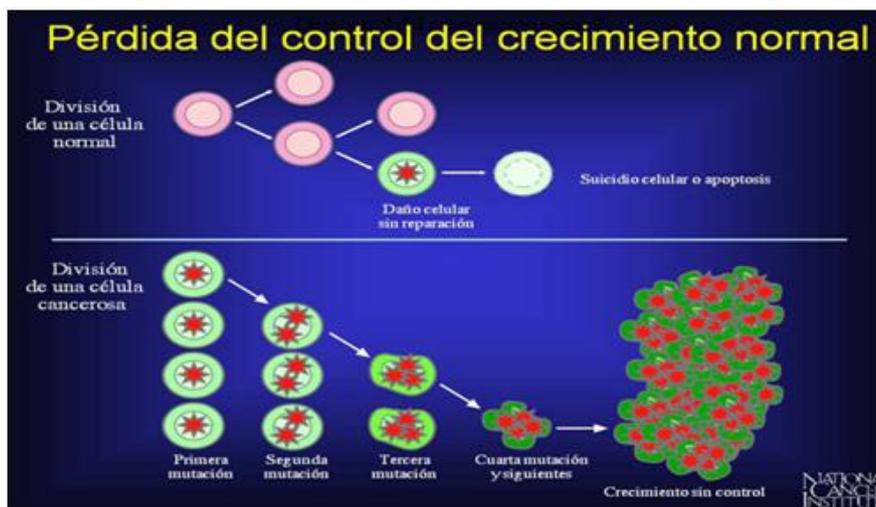


Figura 1. Crecimiento celular. (Imagen tomada de National Cancer Institute)

### **2.1.1. Causas**

Al cáncer no se le atribuye una única causa y puede ser el producto de la interacción conjunta de muchos factores. Los principales factores pueden ser externos (exposición a compuestos químicos y radiaciones o infecciones con virus) o internos (mutaciones heredadas, hormonas o condiciones inmunológica [5]).

Las mutaciones en el ADN generan cambios anormales que comprometen algunas veces la viabilidad celular. Dichas mutaciones a nivel de la línea germinal son pasadas desde los padres a sus hijos, es decir, de generación en generación. Cuando algunos genes afectados por estas mutaciones son heredados se aumenta el riesgo de padecer cáncer.

Los principales genes involucrados en procesos de tumorigénesis son:

- ✓ Oncogenes: son aquellos genes originados a partir de los denominados proto-oncogenes como por ejemplo RET, KIT, MET, los cuales están involucrados en el control de crecimiento y división celular.
- ✓ Genes supresores tumorales: son aquellos genes encargados de disminuir la división celular, reparar el ADN o conducir a la muerte celular (apoptosis). Algunos de estos genes supresores son: TP53 (p53), BRCA1, BRCA2, APC, RB1 [6].
- ✓ Genes de reparación del ADN: codifican proteínas cuya función normal es corregir errores que surgen cuando las células duplican su ADN antes de dividirse.

En células normales estos genes regulan el crecimiento, diferenciación y la apoptosis de las células del organismo.

### **2.1.2. Incidencia y mortalidad**

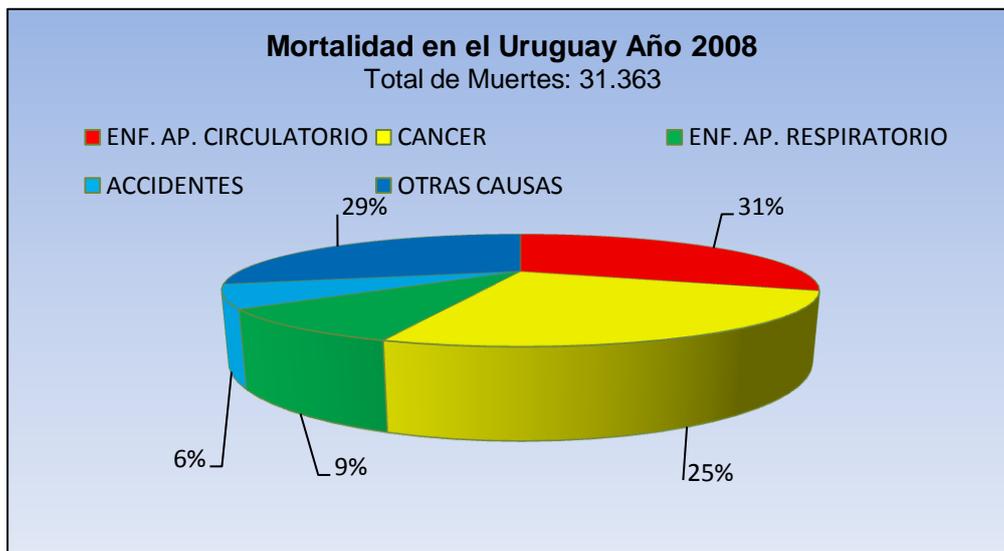
El cáncer es la segunda causa de muerte tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Tan solo en el año 2002 el cáncer causó la muerte de 6,7 millones de personas en todo el mundo, cantidad que supera a las muertes por SIDA, tuberculosis y malaria. Se estima a nivel mundial que el número de nuevos casos de cáncer por año alcance los 21,4 millones y el número de muertes podría aumentar a 13,2 millones en 2030 [7-8].

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más diagnosticado y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres en todo el mundo. El 23% (1,38 millones) del total de nuevos casos pertenecen a este tipo, del cual un 14% (458.400) murió en 2008 [9].

Según la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, en el Uruguay en el año 2008, se registraron alrededor de un 25% de muertes por esta enfermedad (ver figura 2), siendo el

cáncer de mama el que más afecta a la población femenina, que representa el 19,67 % del total de casos (período 2004-2008) [10].

La mayoría de las pacientes diagnosticadas a tiempo con cáncer de mama pueden ser sometidas a procedimientos quirúrgicos siendo potencialmente curables [11]. Por tal motivo, un diagnóstico precoz es vital para tratar esta afección a tiempo y conseguir eliminarla [12].



**Figura 2.** Mortalidad por Cáncer en el Uruguay.  
(Imagen tomada de Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer)

## 2.2. Cáncer de mama

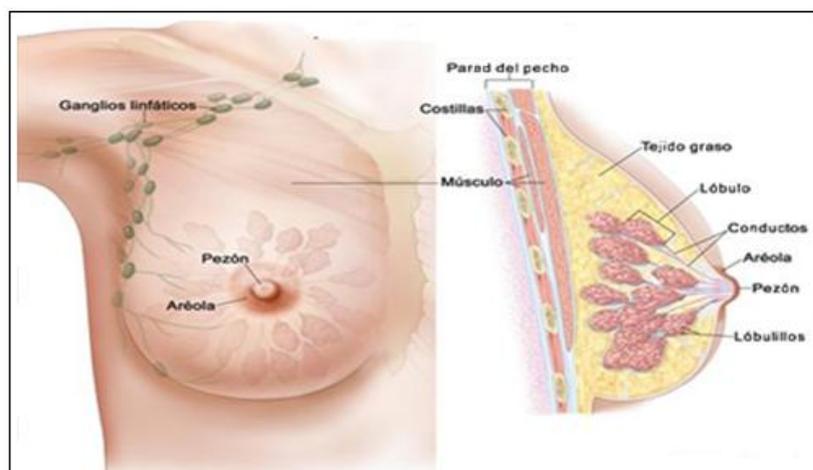
### 2.2.1. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria

Las glándulas mamarias son dos formaciones situadas simétricamente en relación con la línea mediana, en la parte anterior de cada hemitórax entre el borde lateral del esternón y la línea axilar anterior, extendiéndose desde la 2ª a la 6ª costilla. En general, estas poseen forma semiesférica terminada en vértice, el cual está constituido por una región redondeada y pigmentada denominada areola en el centro de la cual podemos observar el pezón.

Está constituida por 15 o 20 lóbulos glandulares de forma cónica y cada uno de estos lóbulos está formado a su vez por numerosos lobulillos donde se encuentran los acinos secretores de leche. Cada lóbulo está separado del resto por tejido conjuntivo y adiposo y, además, poseen un conducto excretor denominado conducto galactóforo. Estos conductos se dirigen hacia el pezón, antes de llegar presentan una dilatación fusiforme de 1,2 a 1,5 mm de ancho que da origen al seno galactóforo donde se almacena la secreción láctea. Cada conducto galactóforo atraviesa luego el pezón para abrirse en los poros galactóforos.

Son tres los orígenes de aporte sanguíneo que pueden llegar a la glándula mamaria: a través de la arteria axilar, arteria torácica interna o mediante las ramas provenientes de las arterias intercostales.

Es de vital importancia funcional la red de vasos linfáticos que rodea a las glándulas mamarias, los cuales tienen un doble origen, cutáneo y glandular. La principal cadena de ganglios linfáticos corresponde a la axilar, a la cual va a parar el 75% de la linfa, le sigue la cadena de nódulos infraclaviculares, supraclaviculares y esternales (ver figura 3) [13].



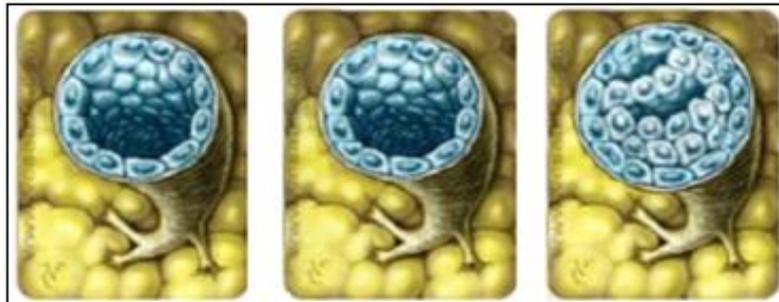
**Figura 3.** Anatomía de la mama femenina. (Imagen tomada de National Cancer Institute)

### 2.2.2. Tipos de carcinoma mamario

#### ➤ Clasificación Histopatológica

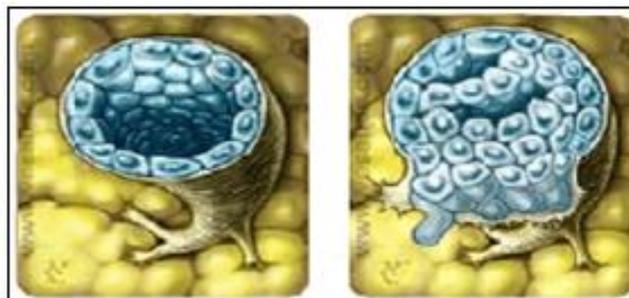
La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el cáncer de mama según su lugar de origen (ductales o lobulillares), por su carácter (*in situ* o invasivo) o por su patrón estructural.

**Carcinoma ductal *in situ* (CDIS):** este tipo de cáncer se origina en las células de las paredes de los conductos mamarios. Se caracteriza por ser un cáncer muy localizado, es decir, que no se ha extendido a otros puntos ni ha producido metástasis (ver figura 4). Este tipo de tumor puede ser detectado fácilmente a través de un estudio de mamografía convencional, puede extirparse quirúrgicamente y su tasa de curación es casi del 100%.



**Figura4.** Carcinoma ductal *in situ*.

**Carcinoma ductal *invasivo* (CDI):** este tipo de cáncer se inicia en el conducto mamario, pero logra atravesarlo (traspasa la membrana basal del tejido) y pasa al tejido adiposo de la mama (ver figura 5). Luego se puede extender a otras partes del cuerpo mediante la circulación linfática, generando sitios de metástasis. Es el más frecuente de los carcinomas de mama y ocurre en el 80% de los casos.



**Figura 5.** Carcinoma ductal infiltrante.

**Carcinoma lobular *in situ* (CLIS):** este tumor se origina en los lóbulos de las glándulas mamarias, y aunque no es considerado un cáncer aumenta el riesgo de que la mujer pueda desarrollar un cáncer en el futuro y suele aparecer antes de la menopausia. Una vez que

es detectado es importante que la mujer se realice una mamografía de control al año y varios exámenes clínicos para vigilar el posible desarrollo de cáncer en el mismo sitio o en otro.

**Carcinoma lobular infiltrante (o invasivo):** este cáncer comienza en las glándulas mamarias, pero se puede extender y puede llegar a destruir otros tejidos del cuerpo. Se ha observado que entre el 10% y el 15% de los tumores de mama son de este tipo de cáncer. Es el carcinoma de mayor dificultad para detectar mediante mamografía.

Existen además otros tipos menos comunes de tumores mamarios entre los que se encuentran el medular, mucinoso (coloidal), el papilar y el tubular, que poseen mejor pronóstico que los carcinomas ductales infiltrantes.

### ➤ **Clasificación según el Estado de Receptores**

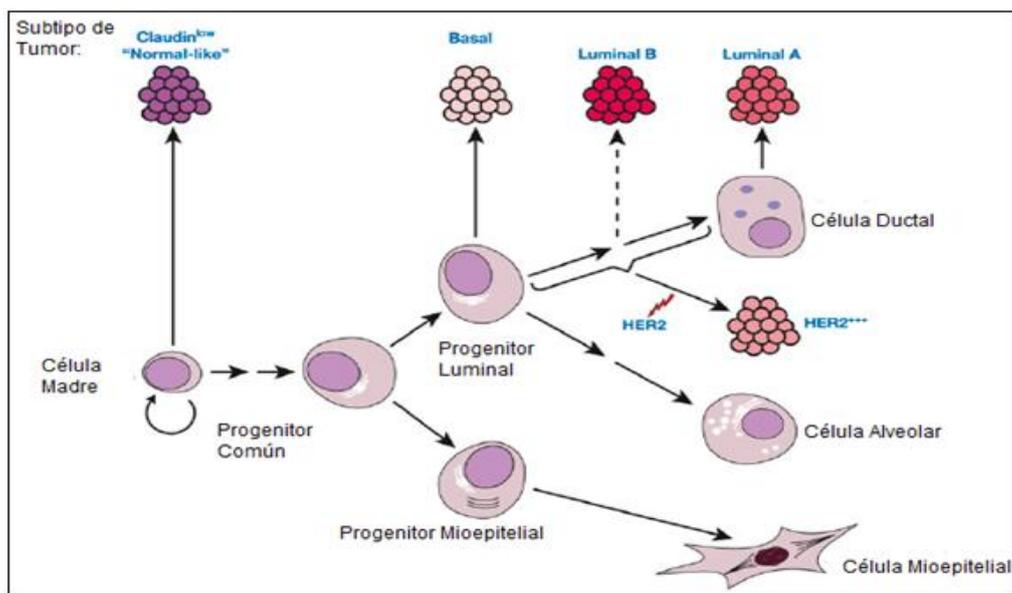
Diferentes tipos de técnicas se han desarrollado para identificar el estadio en que se encuentra el cáncer de mama. Dos de las principales son la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para detectar el nivel de amplificación génica mediante sondas fluorescentes y la inmunohistoquímica (IHC), como método eficaz para teñir células que expresan en su superficie celular diferentes tipos de receptores, empleando para ello reacciones inmunoenzimáticas. Tres de los receptores más evaluados en el cáncer de mama son el receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RgP) y el HER2/neu [14].

La evaluación del nivel de expresión de los receptores se emplea como herramienta para determinar si correspondiese el uso de diferentes tratamientos específicos. Las células cancerosas con receptor de estrógeno positivo (70% de los cánceres de seno) dependen de estrógeno para su crecimiento, por lo que pueden ser tratados con medicamentos para reducir tanto el efecto de los estrógenos (por ejemplo, Tamoxifeno) o el nivel real de estrógeno (por ejemplo, inhibidores de aromatasas). Los tumores HER2+ son considerados con un mal pronóstico [15], sin embargo responden a medicamentos como el anticuerpo monoclonal Trastuzumab (en combinación con la quimioterapia convencional), que ha permitido mejorar el pronóstico de forma significativa [16]. Por otro lado, los tumores que carecen de dichos receptores a falta de tratamientos dirigidos poseen un mal pronóstico [17].

➤ **Clasificación Molecular**

En base a este tipo de perfil, el cáncer de mama ha sido clasificado en cinco subtipos los que incluyen:

- **Basal:** denominado así por el patrón de expresión semejante al de las células epiteliales basales y asociado con el fenotipo del cáncer triple negativo (80%-90%) de similitud. En él se expresan genes de proliferación y un grupo de genes que producen citoqueratinas basales y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). A menudo, poseen el gen p53 mutado y existen evidencias de inestabilidad genómica. La mayoría presenta mutaciones en el gen BRCA1 y se caracterizan por ser tumores muy agresivos [18-19].
- **Luminal A:** es el subtipo más frecuente, representando el 67% de los tumores de mama y en el cual se encuentra sobreexpresado el RE.
- **Luminal B:** posee un peor pronóstico comparado con el Luminal A y presenta un grado elevado de mutaciones del gen p53.
- **ErbB2/HER2+:** es el subtipo que posee el peor pronóstico y alta probabilidad de recaída.
- **Tipo Normal:** representa un perfil de expresión intermedio entre el HER2+ y el subtipo basal [20-22].



**Figura 6.** Modelo esquemático acerca del nivel jerárquico en el tejido epitelial y las posibles relaciones con los subtipos de tumores de mama. (Imagen toma de Genes Dev. 2009, vol. 23)

### **2.2.3. Causas**

El cáncer de mama se caracteriza por ser una enfermedad compleja, heterogénea y multifactorial, en la que intervienen tanto factores genéticos como no genéticos. Entre un 5 y un 10% de cánceres de mama poseen un origen hereditario, el 90% restante posee también un componente genético, pero principalmente poseen un origen esporádico (no heredable) [23].

Los cánceres de mama hereditarios poseen características clínicas e histopatológicas diferentes de las que presentan los cánceres de mama esporádicos. Existen diferentes síndromes que influyen en un aumento en la incidencia de cáncer de mama como el *Síndrome de Li-Fraumeni*, entre otros.

El genoma humano contiene aproximadamente 23000 genes, varios miles de estos (3000-5000) codifican proteínas que participan en los programas genéticos que están desregulados en el cáncer. Algunos de estos corresponden a los genes BRCA1 (región 17q21) y BRCA2 (región 13q12), los cuales están asociados directamente con una mayor incidencia de cáncer en mujeres [24]. Estos genes codifican fosfoproteínas nucleares que interactúan con múltiples procesos biológicos incluyendo fundamentalmente reparación del ADN dañado, regulación de la transcripción, duplicación del centrosoma y regulación negativa del ciclo celular. Por lo tanto, funcionan como activos inhibidores de la progresión neoplásica [25].

La prevalencia de las mutaciones de los genes BRCA en la población en general no se encuentra bien establecida, sin embargo, gracias a modelos de riesgos teóricos se concluye que 1 de cada 300 a 1 en 500 mujeres sanas podrían llevar dentro de su genoma mutaciones en los genes BRCA1 o BRCA2 [26].

También se ha advertido la presencia de otros genes involucrados en la génesis del cáncer de mama. Algunos de ellos son el c-myc, que se sobreexpresa en el 15-25% de los casos [27], el p53 que se encuentra mutado en aproximadamente un 20-30% de los tumores mamarios [28], y algunos otros implicados como los PTEN, ATM y CHK2 [29].

### **2.2.4. Factores de Riesgo**

Los factores de riesgo son diferentes en cada tipo de cáncer y se caracterizan por ser elementos que aumentan la posibilidad de contraer cáncer. El riesgo de padecer cáncer de mama se ve incrementado por la historia familiar de uno o más familiares de primer grado con cáncer de mama. Las mutaciones heredadas en los genes de susceptibilidad al cáncer de mama representan aproximadamente entre el 5 y el 10% de los casos de cáncer de mama femenino y masculino, pero corresponden a casos muy raros [30].

Tanto el medio ambiente como los genes y el estilo de vida inciden de diferente manera para aumentar o disminuir la probabilidad de desarrollar cáncer de mama [31]. Diferentes tipos de eventos en edad temprana y/o tardía en la vida pueden desencadenar e influir en el riesgo de padecer la enfermedad, pero sigue siendo difícil explicar por qué algunas mujeres llegan a desarrollar algún tipo de cáncer de mama y otras no [32].

La mayoría de los cánceres se relacionan con más de un factor de riesgo. Dentro de los factores de riesgo que pueden ser modificados están los hábitos alimenticios, exposición a sustancias químicas, radiación y tabaco. Aquellos factores que no se pueden modificar son la edad, raza, sexo y factores genéticos.

### **2.2.5. Pronóstico**

Se ha observado que el conocimiento del comportamiento de la lesión cancerosa de la glándula mamaria, y básicamente los adelantos en los estudios histopatológicos, han permitido identificar diversos factores pronósticos que unidos ayudan a definir las variantes terapéuticas y la necesidad o no de terapia adyuvante.

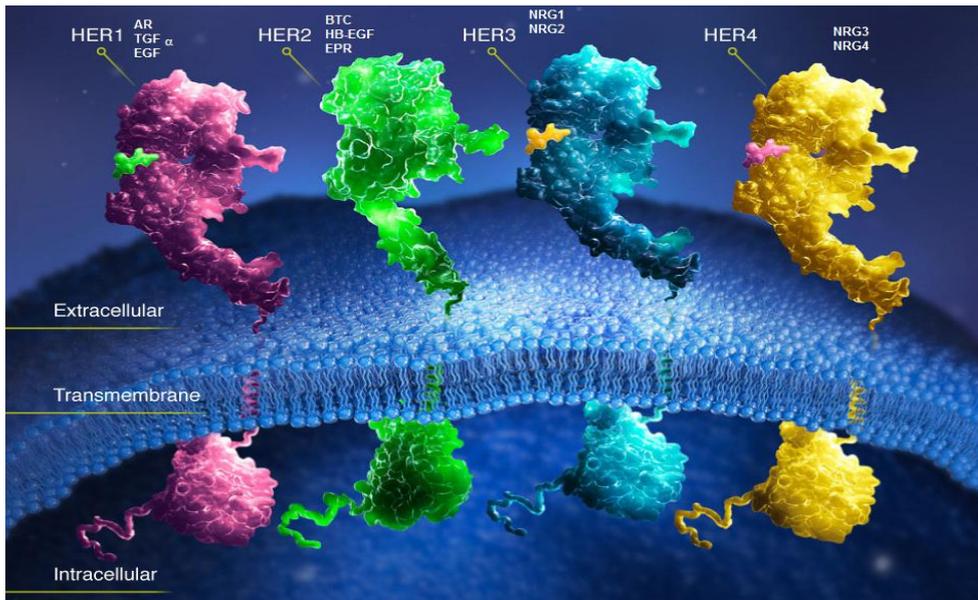
Los principales factores pronóstico y las opciones de tratamiento dependen actualmente del estado de los ganglios axilares, el tamaño tumoral, el tipo y grado histológico, la edad y algunos marcadores moleculares bien caracterizados mediante técnicas inmunohistoquímicas como los receptores RE, RgP y HER2/neu [33].

## **2.3. Receptores del Factor de Crecimiento Epidérmico**

La continua comunicación intercelular y la correcta integración de todas las señales es lo que, entre otras cosas, permite mantener la vida en un organismo superior. Para poder llevar a cabo esta comunicación las células producen una gran cantidad de proteínas con capacidad para unir una variedad de ligandos como factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, etc.

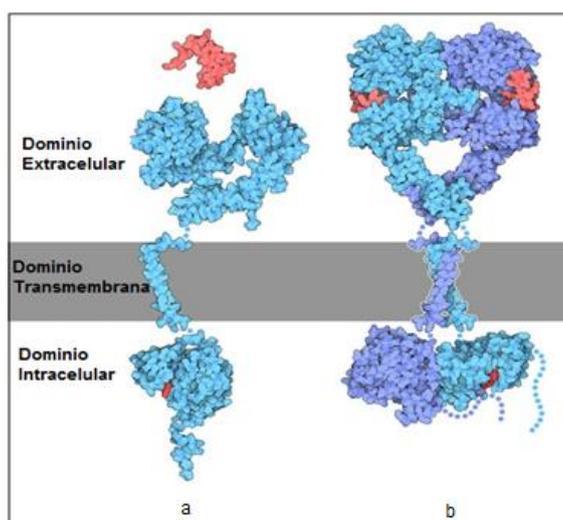
Existe un grupo de proteínas muy estudiado denominado *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR). Esta familia de receptores está relacionada con una serie de procesos vitales de los organismos multicelulares como son el desarrollo, diferenciación, migración, adhesión y apoptosis celular [34].

La familia de receptores EGFR consta de cuatro miembros estrechamente relacionados: EGFR/ErbB1/HER1, los HER-2/ ErbB2, HER-3/ ErbB3 y HER-4/ ErbB4 (ver figura 7) [35].



**Figura 7.** Familia de receptores EGFRs/ HERs con sus respectivos ligandos.  
(Imagen tomada de [www.bioncology.com](http://www.bioncology.com))

En general, los receptores de esta familia poseen una estructura similar que se divide en tres regiones, una región N-terminal extracelular con un dominio de unión al ligando, una región C-terminal intracelular con actividad de tirosina quinasa y una región en  $\alpha$ -hélice que se extiende a través de la membrana y ancla al receptor a la superficie celular (ver figura 8) [36]. Se ha demostrado que el dominio C-terminal (extracelular) de estos receptores se encuentra conservado, así como también ocurre con la región N-terminal que es la responsable de la actividad tirosina quinasa, salvo en el caso de HER3 que no posee actividad catalítica, aunque es capaz de unir ATP y transmitir señales mitogénicas mediante su heterodimerización con otros miembros de esta familia de receptores [37]. La región extracelular posee 4 dominios (I, II, III, IV). Se ha observado que los dominios I y III están relacionados con la unión al ligando, mientras que los restantes dominios II y IV están involucrados en el proceso de dimerización entre los receptores [38].



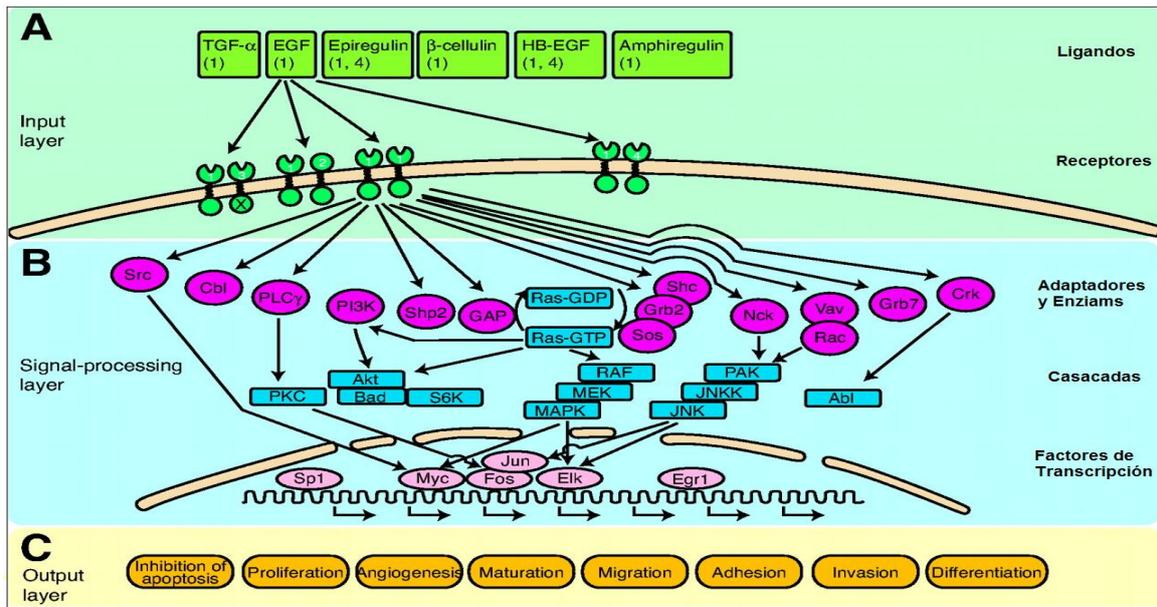
**Figura 8.** a) Receptor de la familia EGFR/HER; b) dímero generado por la interacción con el ligando. (Imagen tomada de [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))

En células normales el receptor HER1 se encuentra involucrado en el normal crecimiento de la célula, en su diferenciación y en su reparación, así como en el desarrollo de todas las estructuras epiteliales del sistema respiratorio, en el tracto gastrointestinal, en el tejido epidérmico, en los folículos pilosos y en el desarrollo mamario [39]. Los receptores HER2 y HER4 poseen un papel crítico en el desarrollo del corazón y estructuras de origen neuronal [40]. El receptor HER3 está relacionado con la formación de precursores de las células de Schwann dentro del sistema nervioso central [41].

Actualmente tanto el HER1 como el HER2 son considerados dos importantes marcadores asociados con diferentes procesos tumorales y se asocian con una mayor velocidad de crecimiento, mayor probabilidad de ocurrencia de metástasis y un peor pronóstico para el paciente.

### **2.3.1. Ligandos de la familia EGFR**

La familia de receptores EGFR puede interactuar con una docena de ligandos capaces de realizar múltiples combinaciones receptor-ligando, permitiendo así una gran diversidad de señales intracelulares (ver figura 9) [42].



**Figura 9.** Cascada de señalización del EGFR. A) Ligandos y combinaciones diméricas del receptor EGFR; B) Vías y factores de transcripción; C) Procesos celulares. (Imagen tomada de Nature Molecular Cell Biology, 2001).

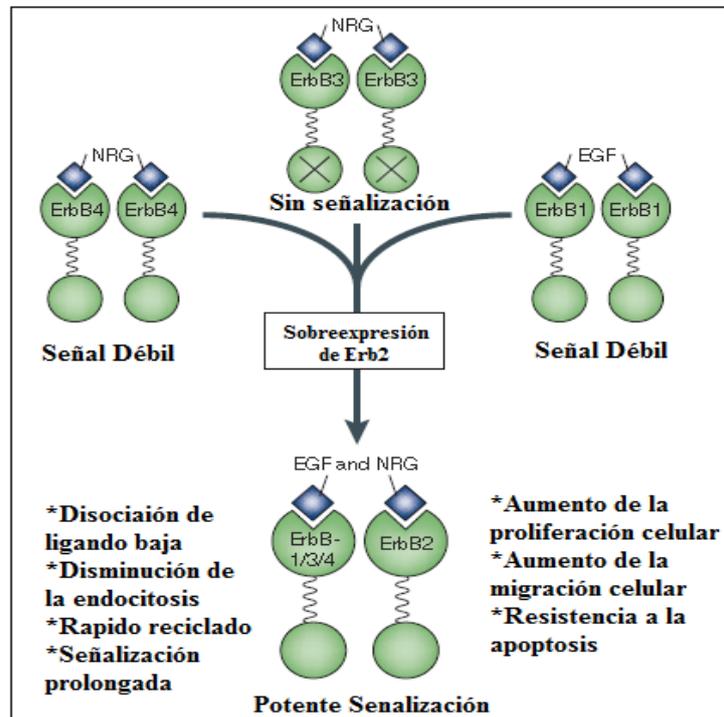
El primer ligando conocido fue el *Factor de Crecimiento Epidérmico* (EGF) con alta afinidad por el receptor HER1 y posee un motivo estructural distintivo que se repite en varios péptidos extracelulares. La región consta de 50-60 aminoácidos en la cual se encuentran presentes 6 cisteínas con la siguiente configuración:  $X_NCX_7CX_{2-3}GX_{10-13}CXCX_3YXGXRCX_4LX_N$ .

Se pueden distinguir tres grupos de ligandos de los receptores HER funcionales en cuanto a sus capacidades de unir y activar cualquier receptor. En el primer grupo están incluidos el EGF, el Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF- $\alpha$ ) y la Anfiregulina (AR), que son capaces de unir y activar a homodímeros del EGFR y a heterodímeros de esta familia. En un segundo grupo incluimos a las Neuregulinas (NRGs-1 y NRGs-2), que se unen a homodímeros de HER3 o de HER4 y a heterodímeros de estos con otros receptores de esta familia. En el tercer grupo están la Betacelulina (BTC), la Epiregulina (EPR) y la Heparina de Unión de EGF (HB-EGF), que pueden activar tanto a homodímeros de EGFR o de HER4, como a heterodímeros de cada uno de ellos con otros miembros de la familia. El HER2/Neu es, sin embargo, un receptor huérfano debido a que carece de un ligando directo conocido se activa por la heterodimerización con otros receptores previamente activados [43-45].

### **2.3.2. Dimerización y activación de los EGFRs**

Cuando los EGFRs se encuentran inactivos (sin ligando) cada uno existe como un monómero en la superficie celular, cuando el ligando específico se une este promueve la homodimerización o la heterodimerización entre diferentes miembros de la familia de receptores HER. La falta de dominio tirosina quinasa o la falta de un ligando específico para el receptor genera la necesidad de establecer una red de interacciones con otras proteínas de la superficie celular para ser activas [46].

Como se puede apreciar en la figura 11 la dimerización y especialmente la heterodimerización de estos receptores genera las respuestas mitogénicas más potentes y con mayor capacidad transformante, en comparación con la formación de homodímeros [47-48]. Además, hay diferencias en el grado de la señalización intracelular generada para las diferentes configuraciones y combinaciones entre los receptores, siendo débil la señalización de los homodímeros (HER1/HER1). En cambio, es nula en los homodímeros de HER3 y es alta en los heterodímeros (HER2/HER1, HER3, HER4) en donde la participación de HER2 potencia dicha interacción [49]. El aumento de afinidad por el EGF, la mayor estabilidad y aumento del reciclado de receptores se producen cuando HER1 y HER2 se dimerizan [50]. Aquellos cánceres con alta expresión de HER1 o HER2 tienen un mejor pronóstico que los cánceres que tienen una alta expresión simultánea de ambos receptores [51]. También se ha descubierto principalmente en tumores de cabeza y cuello un receptor mutante, el EGFRvIII que posee una delección de 267 aminoácidos en la porción extracelular que no se encuentra en células normales, que no es capaz de unirse a un ligando específico ni de dimerizarse con otro, pero que ha conservado el dominio quinasa y es capaz de generar una respuesta constitutiva, siendo una clara evidencia del alto índice de amplificación asociada al EGFR [52].



**Figura 10.** Importancia de la dimerización en la acción de los EGFRs.  
(Imagen tomada de [www.nature.com/reviews/molcellbio](http://www.nature.com/reviews/molcellbio))

### **2.3.3. EGFRs en la biología tumoral**

La familia de EGFRs juega un papel clave en el comportamiento de las células malignas en una variedad de tumores humanos, ya que induce el aumento de la proliferación, disminuye la apoptosis, favorece la angiogénesis y mejora la movilidad de las células tumorales [53].

Se ha observado que la mayoría de las células normales tienen entre 20.000 y 200.000 EGFRs, pero el número de receptores en la superficie de células tumorales puede elevarse a 2.000.000, confirmando la importancia que tienen en el desarrollo de diferentes tipos de tumores. En el cáncer de mama la cantidad de receptores HER1 presentes en la superficie de las células tumorales puede aumentar desde un 14% hasta un 90% (ver tabla 1) [54]. Mientras que está claro que HER1 se expresa en una gran variedad de tumores humanos, estudios más detallados han revelado que su expresión aumenta con el estadio de la enfermedad, haciéndose más prominente durante la metástasis, o tras la aparición de la resistencia a la quimioterapia [55].

**Tabla 1.** Sobreexpresión y desregulación de EGFR (HER1), HER2 en tumores humanos.  
(Imagen tomada de [www.biocancer.com/journal](http://www.biocancer.com/journal))

Tipo de Tumor	Expresión de EGFR/HER1 (%)	Mutaciones EGFR/HER1 (%)	Expresión de HER2 (%)
Mama	14-91	78	15-30
Colorrectal	25-77	ND	nov-20
Esófago	35-88	ND	ND
Glioblastoma	40-60	57	ND
HNSCC	95	ND	ND
Ovario	35-70	73	0-32
Páncreas	30-50	ND	19-45
Próstata	41-100	ND	14-86

La tabla muestra el rango de variación en la sobreexpresión de los receptores HER2 y HER1 en diferentes tumores.  
HNSCC - Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.  
ND - Datos no disponibles

#### **2.3.4. EGFR/HER1 como blanco tumoral**

Las principales terapias desarrolladas contra diferentes clases de tumores malignos se basan en diferencias importantes y específicas entre las células tumorales y las células normales, lo cual permite una acción terapéutica o diagnóstica contra aquellos marcadores que se corresponden a un fenotipo maligno.

Estudios moleculares han demostrado que la inhibición específica de la dimerización y la señalización mediada por HER1 es una estrategia terapéutica extremadamente eficaz frente al proceso oncogénico.

Si bien el HER1 es fundamental en el normal desarrollo y el knockout del mismo es embriológicamente letal en ratones a causa de las anormalidades en el correcto desarrollo de la piel, pulmones, cerebro, riñones y del tracto gastrointestinal [56-57].

La expresión desregulada del HER1 en diferentes tipos de cánceres se encuentra directamente relacionada con la malignidad de algunos tumores y con un mal pronóstico para los pacientes con dicha enfermedad. Por tal motivo, el HER1 se ha convertido en uno de los principales blancos de las terapias contra el cáncer [58].

Los principales enfoques terapéuticos que se han desarrollado para lograr detener las diferentes señales de transducción tras la activación de los EGFRs han sido pequeñas moléculas inhibidores de tirosina quinasa. Estas actúan interfiriendo con la unión del ATP al receptor, y mediante la utilización de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la porción extracelular del receptor, inhibiendo así la dimerización y autofosforilación [59].

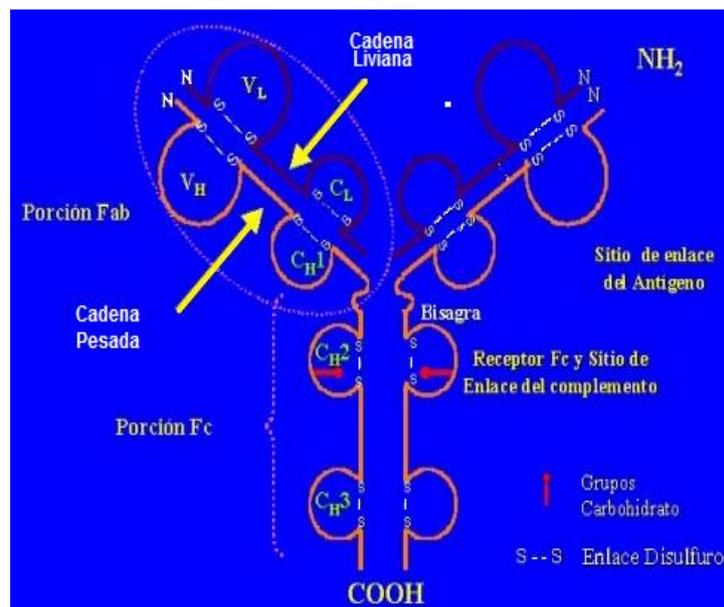
## 2.4. Anticuerpos

Desde su descubrimiento hacia finales del siglo pasado, los anticuerpos han cautivado la atención de diferentes áreas del conocimiento como la medicina y la bioquímica, entre otras áreas científicas. La gran potencialidad de estas moléculas para ser usadas en aplicaciones diagnósticas y terapéuticas profilácticas fue inmediatamente reconocida por toda la comunidad científica.

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas solubles, sintetizadas y secretadas por los glóbulos blancos denominados linfocitos B [60]. Han sido localizados en casi todos los fluidos y cavidades corporales y en mamíferos se han encontrado cinco clases de Ig: M, G, A, D y E. A pesar de que cada uno de ellos posee un metabolismo y fisiología característica, la elevada especificidad que poseen por un antígeno es su aspecto más interesante [61].

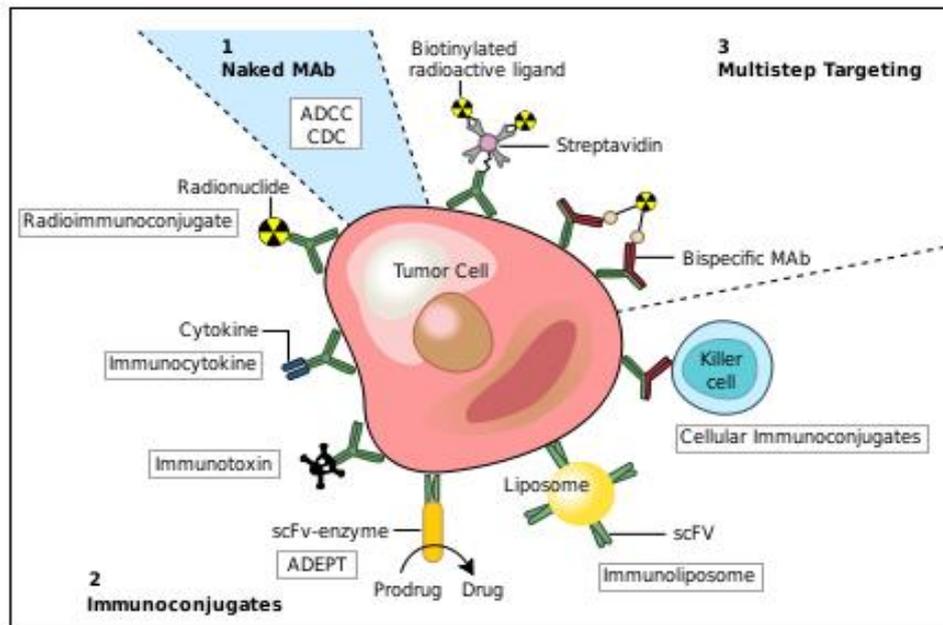
Sin embargo, independientemente de su especificidad todas comparten una estructura básica común que bien puede ser ejemplificada por la molécula IgG. Básicamente, la molécula de anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (~50 kDa) denominadas H (del inglés *heavy*), y un par de cadena livianas (~25 kDa).

Las cadenas pesadas están unidas entre sí por al menos un puente disulfuro, tal unión está localizada en una región conocida como *bisagra*, región formada por aproximadamente 12 residuos de aminoácidos que proporciona una gran flexibilidad a la molécula. Estos residuos son susceptibles a la ruptura química y enzimática (ver figura 11) [62].



**Figura 11.** Representación esquemática de un anticuerpo.  
(Imagen tomada de [www.grupos.emagister.com](http://www.grupos.emagister.com))

En 1906, Paul Ehrlich fue el primero en proponer el uso de la elevada especificidad y afinidad de los Ac para atacar células neoplásicas de forma específica (ver figura 12), utilizando a estos como portadores de agentes farmacológicos, aunque su uso se ha extendido enormemente.



**Figura 12.** Algunas de las estrategias para terapia y de diagnóstico utilizadas con los Ac. (Imagen tomada de [www.oryzon.com/es/anticuerpos-monoclonales](http://www.oryzon.com/es/anticuerpos-monoclonales))

### 2.4.1. Anticuerpos monoclonales

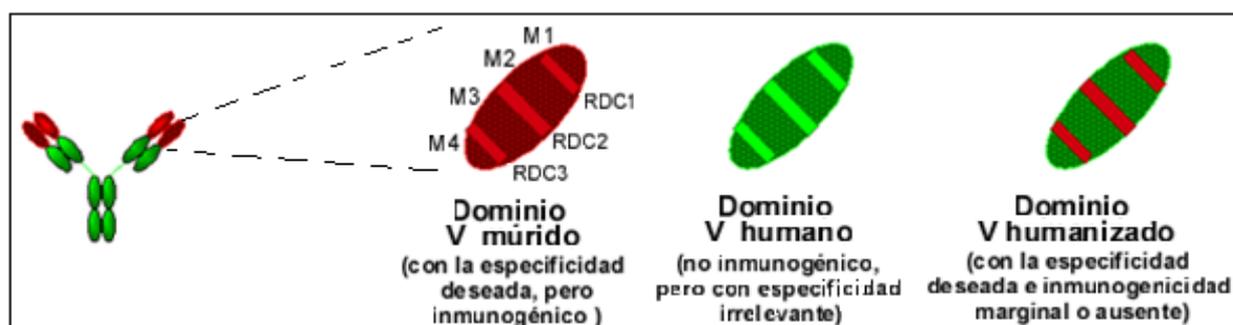
Se caracterizan por ser una población de moléculas de anticuerpo, todas idénticas, las que consecuentemente poseen todas la misma especificidad. En 1975, G. Kohler y C. Milstein demostraron que es posible producir anticuerpos monoclonales mediante la fusión de linfocitos B con células mielomatosas (células tumorales inmortal) y aislar aquellos híbridos secretores de interés [63].

La mayoría de estos anticuerpos son de origen murino y producidos por una combinación híbrida derivada de la fusión de una línea celular de mieloma inmortal, con una célula B productora de un anticuerpo específico conocido, a partir de un ratón inmunizado con células enteras, extractos celulares o antígenos purificados.

Sin embargo, la persistencia de reacciones inmunes contra estos anticuerpos llevó a la creación de los anticuerpos quiméricos en los que las porciones constantes de las cadenas pesada y liviana provienen de una Ig humana y las regiones variables  $V_H$  y  $V_L$  son obtenidas

de un anticuerpo monoclonal murino. Su construcción benefició la disminución de la inmunogenicidad en los seres humanos pero sin afectar la especificidad del anticuerpo.

Desgraciadamente, algunos anticuerpos quiméricos aún son capaces de inducir una respuesta inmune humoral cuando son administradas en humanos. Por tal motivo, surgen los anticuerpos humanizados, en donde las Regiones Determinantes de la Complementariedad (CDR) de un anticuerpo murino son trasplantados en las regiones M humanas (ver figura 13), formándose así una región V híbrida ratón-humano y confiriéndole la especificidad deseada a una molécula, que en el resto de su estructura es completamente humana. La ventaja que posee es que los epítomos asociados a las regiones M murinas, los cuales están presentes en los anticuerpos quiméricos, no se encuentran en los humanizados [64].



**Figura 13.** Obtención de Anticuerpos Monoclonales Humanizados. (Imagen tomada de <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/SegGener.htm>).

Uno de estos anticuerpos monoclonales humanizados desarrollados es el *Nimotuzumab* (hR3), un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente al dominio III extracelular del EGFR/HER1 inhibiendo la activación tirosina quinasa que este posee.

#### 2.4.2. CIMAher® Nimotuzumab

El Nimotuzumab (hR3) fue creado en el Centro de Imagenología Molecular de la Habana (ver figura 14). Es una inmunoglobulina que pertenece a la subclase IgG1 y tiene un peso molecular de 150 kDa.

Su gran capacidad para unirse a HER1 ha llevado a que en muchos países se emplee en el tratamiento de tumores de cabeza, cuello y gliomas, así como también en cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, esófago, cervical y de mama [65].

Para obtener el anticuerpo humanizado se realizó la inserción de las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo monoclonal murino ior-egf/r3 dentro del marco de lectura de una inmunoglobulina humana, que reconoce con alta especificidad el dominio externo del HER1 [66].



**Figura 14.** CIMAhher® Anticuerpo monoclonal recombinante Humanizado Nimotuzumab (hR3).  
(Imagen tomada de [www.cimaher.com](http://www.cimaher.com))

El hR3 reconoce su receptor blanco, el HER1, con similar afinidad que su predecesor murino ( $10^{-9}M$ ) sin embargo, la humanización del anticuerpo incrementa la eficacia terapéutica y a su vez disminuye los efectos secundarios asociados, como erupciones en la piel (rash cutáneo), responsables muchas veces de la interrupción de su empleo como agente antitumoral[67-68]. El hR3, como otros anticuerpos monoclonales humanizados, es evaluado como agente de diagnóstico para imagenología molecular.

## 2.5. Imagenología y Cáncer

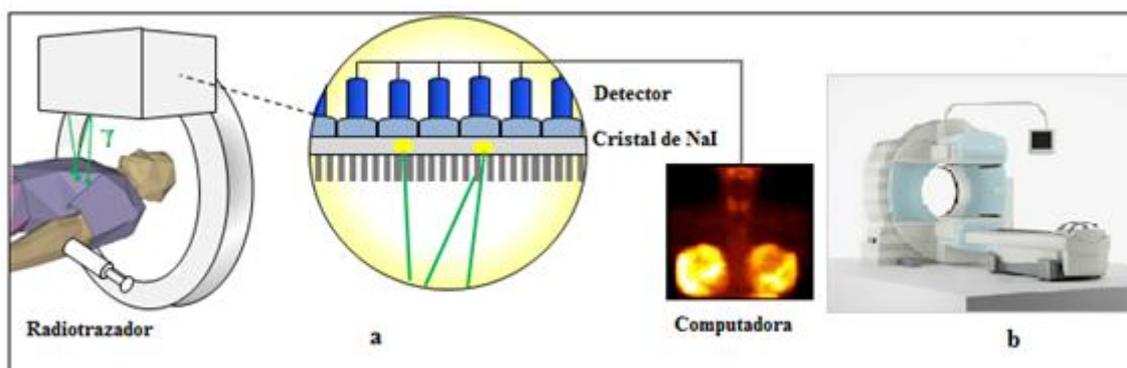
El correcto diagnóstico del cáncer posibilita en la mayoría de los casos altas posibilidades de remisión. El método de diagnóstico final para confirmar la presencia real de cáncer lo constituye la biopsia, aunque presenta algunas desventajas ya que es una técnica invasiva y dolorosa, afecta el microambiente tumoral y en muchos casos se puede perder información relevante debido a un muestreo no representativo como consecuencia de la heterogeneidad tumoral.

Sin embargo, múltiples son las técnicas de imágenes aplicadas en el abordaje del cáncer que brindan información morfológica, estructural, metabólica y funcional de diferentes tejidos de interés clínico. Actualmente, el rol de la imagenología se centra en el screening y seguimiento de la enfermedad, mientras que su rol a futuro se relaciona con aspectos presintomáticos, así como con el desarrollo de terapias dirigidas y menos invasivas.

La mayoría de los sistemas de imagenología se basan en la interacción de radiación electromagnética con los tejidos y fluidos corporales. En una primera aproximación, las

técnicas de imagen médica pueden clasificarse atendiendo al tipo de señal en el que basan su funcionamiento:

- Basadas en radiación no ionizantes:
  - Resonancia magnética (RM): su fundamento se basa en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos.
  - Ecografía: utiliza el sonido como forma de examinar al paciente.
- Basadas en radiación ionizantes:
  - Imagen por Rayos X: un emisor externo al paciente emite una fuente de Rayos X y un sensor situado tras el organismo detecta los que han conseguido atravesarlo.
  - Tomografía computarizada (TC) o Tomografía Axial Computarizada (TAC): basada en Rayos X permite obtener una imagen tridimensional del paciente.
  - Centellografía: se basa en la posibilidad de detectar desde el exterior las radiaciones emitidas por una sustancia radiactiva incorporada a un organismo. La radiación se detecta con una gammacámara, que construye la imagen de la distribución del radiotrazador en la región de estudio (ver figura 15).
  - Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Únicos (SPECT): está basada en la formación de imagen mediante la detección de rayos gamma, proporciona una imagen tridimensional de la distribución del radiotrazador en la región a estudiar. Para ello, se utiliza una gamma-cámara rotatoria, lo que permite su posterior reconstrucción en 3D.
  - Tomografía por Emisión de Positrones (PET): emplea un radiotrazador que emite positrones que se aniquilan inmediatamente al encontrar un electrón del organismo, emitiendo dos rayos gamma de 511 KeV y con sentido opuesto. Se utilizan dos detectores opuestos para generar la imagen 3D [69].



**Figura 15.** a) Esquema del proceso de generación de imagen por gamma cámara; b) Gamma Cámara. (Imagen tomada de <http://grupo1mod2.wordpress.com/medicina-nuclear>)

Entre toda esta variedad de técnicas, la *Imagenología Molecular* surge como la disciplina que engloba a todas las técnicas de imagen que visualizan la función celular y el seguimiento de los procesos moleculares en organismos vivos sin perturbarlos, unificando la biología molecular con la imagen *in vivo*, para lo cual genera imágenes 2 o 3D y teniendo la capacidad de medir todas las fluctuaciones que se suceden en el tiempo. Las técnicas pueden integrar el uso tanto de radiotrazadores (medicina nuclear), como de resonancia magnética, espectroscopía por resonancia magnética, imágenes ópticas, ultrasonido y otras. El diagnóstico llevado a cabo por la imagenología molecular *in vivo* tiene el potencial para detectar y caracterizar tumores en los primeros estadios de su desarrollo, así como orientar la mejor estrategia de tratamiento para el paciente [70].

Actualmente, se emplean con fines clínicos diferentes tipos de moléculas como por ejemplo la  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-2-deoxy-D-glucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG) para imagen por PET dirigido contra células con alto índice metabólico [71], nucleótidos modificados como el 3'-deoxy-3'- $^{18}\text{F}$  fluorotimidina (FLT) también para PET, péptidos como el  $^{111}\text{In}$ -Pentetreotide muy usado como análogo de la somatostatina para detectar mediante SPECT sobreexpresión de tumores de origen neuroendócrino [72]. Además, se han desarrollado diferentes anticuerpos con el fin de diagnosticar, como  $^{111}\text{In}$ -Ibritumomab tiuxetan,  $^{111}\text{In}$ -Trastuzumab dirigido contra EGFR2/HER2 y el  $^{111}\text{In}$ -Cetuximab dirigido contra el EGFR2/HER1 [73].

## 2.6. Radiofármacos

Un radiofármaco es una sustancia que se caracteriza por poseer un átomo radiactivo en su estructura molecular y que, por su forma farmacéutica, cantidad y calidad de radiación, puede ser administrado en los seres humanos con fines de diagnóstico o terapéutico.

Según sus aplicaciones en medicina nuclear se los puede clasificar en radiofármacos de diagnóstico o de terapia. También pueden ser clasificados de acuerdo a sus propiedades químicas, físicas o biológicas. En general, un radiofármaco presenta dos partes bien definidas: la molécula soporte a la que se une el radionucleido y que condiciona la ruta metabólica del radiofármaco dentro del organismo y el radionucleido propiamente dicho que emite radiación, permitiendo la detección externa del radiofármaco y el análisis del proceso biológico de interés. En su mayoría son compuestos orgánicos o inorgánicos con composición definida, que van desde moléculas simples a un grado de complejidad mayor como los anticuerpos, sus fragmentos, péptidos, oligonucleótidos y demás [74-75].

### **2.6.1. Radiofármacos para diagnóstico**

Los radiofármacos de diagnóstico permiten visualizar la anatomía de un órgano o sistema, evaluar el comportamiento fisiopatológico a nivel de los tejidos, analizar el comportamiento bioquímico o determinar cuantitativamente parámetros farmacocinéticos.

Tanto para la centellografía gamma y SPECT las moléculas son marcadas con radionucleidos emisores gamma y la energía óptima se encuentra entre 30-300 KeV. En cambio, para la tomografía de emisión de positrones PET se utilizan isótopos emisores de positrones. Las dosis administradas a pacientes no buscan generar un efecto farmacológico y, por esta razón, son utilizadas bajas concentraciones ( $10^{-6}$  a  $10^{-8}$  M) buscando actuar como verdaderos radiotrazadores [76].

Sus propiedades químicas deben permitir la unión a moléculas de interés y la relación de actividad entre órgano *blanco* y *no blanco* debe ser la mayor posible. El comportamiento biológico debe ser acorde a la patología que se quiere diagnosticar y debe ser de un período de semieliminación biológico corto.

Para la administración a pacientes un radiofármaco de diagnóstico requiere que su pureza radioquímica (PRQ) sea mayor a 90%, puesto que la inyección de una mezcla diversa de especies del radionucleido disminuye la captación en el órgano blanco, y aumenta innecesariamente la dosis de la radiación en órganos no blancos. En caso de que el radiofármaco sea de terapia se exige una PRQ mayor a 95%.

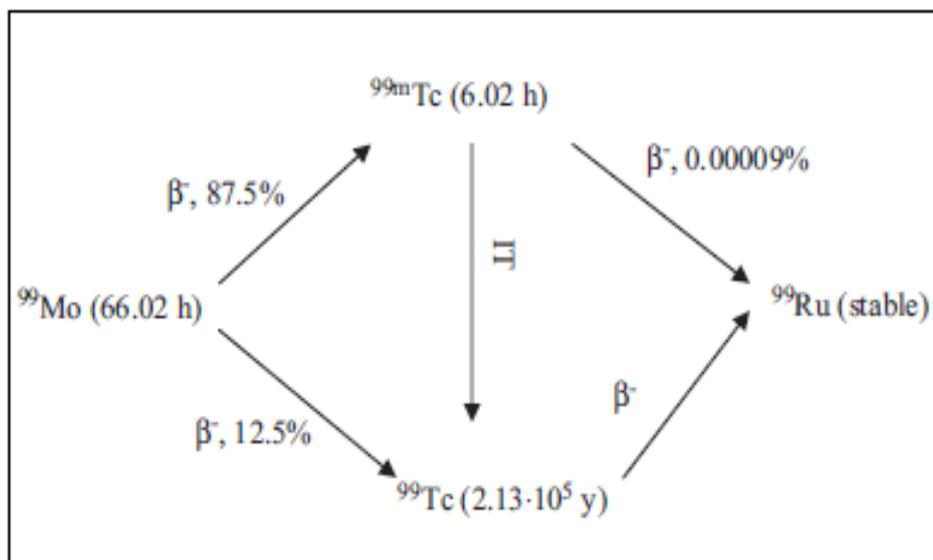
Los radiofármacos de diagnóstico son generalmente complejos metálicos y permiten a nivel clínico un amplio rango de posibilidades gracias a la diversidad de propiedades tanto químicas como nucleares (tipo de radiación, período de semidesintegración, gran capacidad de coordinación, entre otras). Entre estos, el  $^{99m}\text{Tc}$  es el más ampliamente utilizado en medicina nuclear [77].

El empleo de agentes de imagen molecular, al permitir un abordaje mínimamente invasivo y, además, permitir la obtención de información tanto fisiológica como funcional de la totalidad del paciente, ha mejorando la capacidad de encontrar procesos como metástasis los cuales son complementarios al diagnostico mediante una biopsia [78].

### 2.6.2. Química del $^{99m}\text{Tc}$ y sus usos

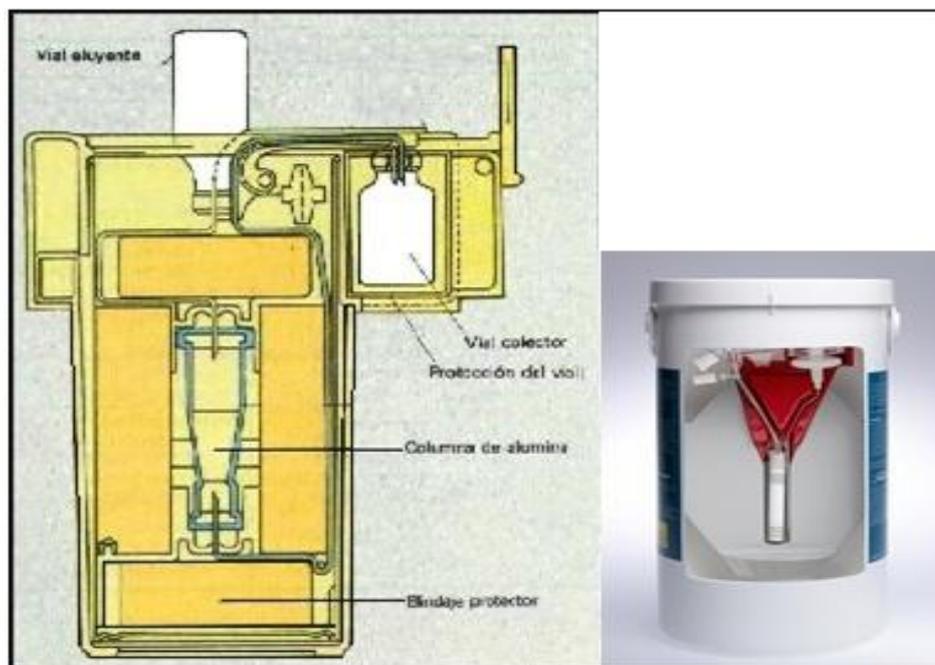
El Tecnecio (Tc) es el elemento con número atómico 43, ubicado en el grupo 7, descubierto en 1937 por Perrier y Segré. Se caracteriza por poseer varios estados de oxidación (-1 a +7), siendo el estado más estable y característico el +7, que se forma por la oxidación directa del oxígeno y el estado +4. Los demás estados de oxidación se encuentran en algunos compuestos debido a que presentan la tendencia a oxidarse hasta el estado +7 [79].

Todos los isótopos del Tc son artificiales y radiactivos, pero su aplicación en medicina se basa en el uso del  $^{99m}\text{Tc}$ , por su modo de decaimiento por emisión gamma, por su corta vida media 6,04 h, y la energía de 140 keV de su radiación que lo hacen el isótopo más empleado con fines médicos. El  $^{99m}\text{Tc}$  se genera a partir del radionucleido padre  $^{99}\text{Mo}$  por decaimiento  $\beta^-$  (ver figura 16).



**Figura 16.** Diagrama de decaimiento del  $^{99}\text{Mo}$ .  
(Imagen tomada de Applied Radiation and Isotopes, 2007, vol. 65).

Se obtiene a partir de un generador que presenta el  $^{99}\text{Mo}$  adsorbido a una columna de alúmina y permite la elución del  $^{99m}\text{Tc}$  con disolución salina fisiológica (NaCl 0.9%) en forma de solución estéril, apirógena y libre de portador (ver figura 17) [80].



**Figura 17.** Generadores  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

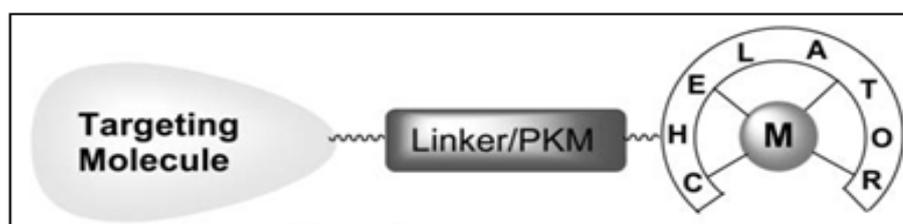
(Imagen tomada de <http://enfoqueradiologico.blogspot.com/2013/01/lantheus-anuncia-el-primer-generador.html>)

Los avances en medicina nuclear de diagnóstico a través de los años transcurridos desde el descubrimiento en 1937 del  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  son numerosos. Aproximadamente el 80% de las moléculas radiomarcadas actualmente con fines de diagnóstico se realizan con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  gracias a sus propiedades físicas, químicas, su bajo costo económico y su fácil adquisición de generadores de  $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$  [81]. Por consecuencia, ha llevado a que este radionucleido sea el caballo de batalla en medicina nuclear de diagnóstico [82].

La versátil química que posee el Tecnecio, producto de los 8 posibles estados de oxidación, así como del adecuado conocimiento de la relación estructura-actividad biológica, ha permitido generar una gran variedad de radiofármacos capaces de generar imágenes tanto morfológicas como funcionales de una gran variedad de órganos y procesos biológicos [83].

De acuerdo con el criterio de diseño, los radiofármacos pueden ser divididos en tres generaciones. La primera generación empezó en 1961 con el uso del ion pertecneiato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) para el estudio de la glándula tiroides, en la cual su acumulación está motivada a que este es selectivamente captado allí [84]. Luego surgió una segunda generación de radiofármacos con la necesidad de diseñar complejos de Tecnecio en los que la biodistribución y captación en el blanco dependen exclusivamente de su lipofilicidad, tamaño y carga. Posteriormente, surgió el desarrollo de una tercera generación de radiofármacos que consistió en la marcación de moléculas y biomoléculas con actividad biológica específica, capaces de reconocer diferentes moléculas blanco en diferentes procesos patológicos. Estos

radiofármacos constan principalmente de cuatro partes: la biomolécula (BM), un linker, un agente quelante bifuncional (QBF) y el radionucleido (ver figura 18). Debido a que la molécula marcada debe ser biológicamente activa, las estrategias de marcación deben apuntar al mantenimiento de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de la molécula, lo que debe ser minuciosamente estudiado [85-87].



**Figura 18.** Esquema de una biomolécula blanco específico marcada a través de un QBF.  
(Imagen tomada de Chem. Rev. 1999, vol. 99)

### 2.6.3. Algunas Estrategias

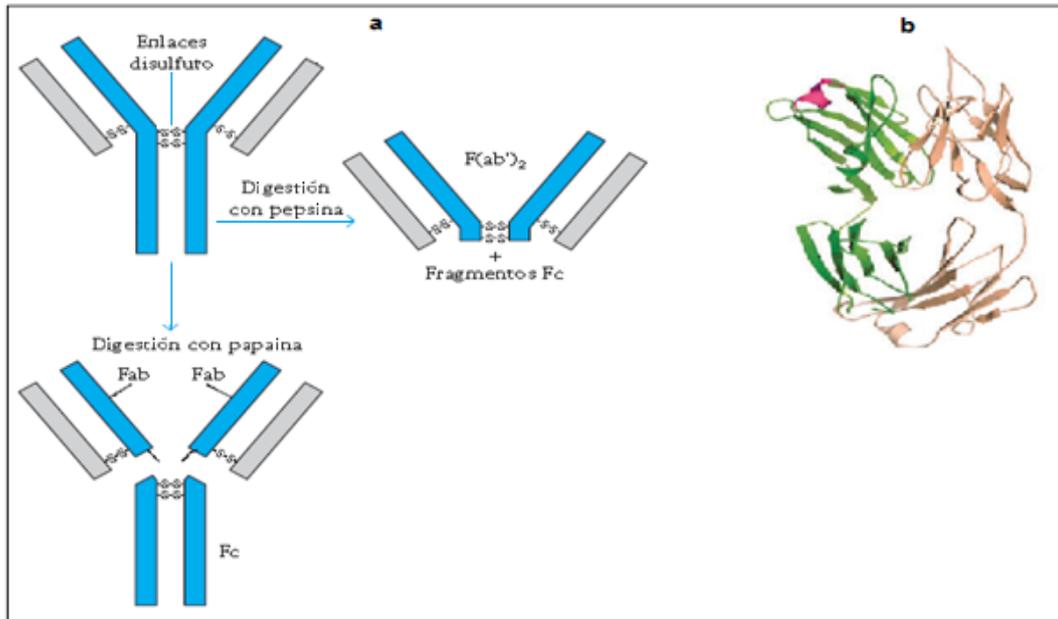
Los anticuerpos monoclonales como tal pueden no ser el formato más favorable para la administración *in vivo* de radionucleidos dirigidos hacia tejidos blancos. Su larga vida media en circulación (de días a semanas) lleva a una elevada actividad durante largos períodos de tiempo, lo que reduce el contraste en estudios por imágenes. Además, un problema similar surge en las aplicaciones de radioinmunoterapia, porque prolonga el tiempo de exposición a la radiación de los órganos y tejidos normales, incluyendo la médula ósea [88]. Moléculas con pesos entre 25-70 kDa poseen un menor tiempo de depuración sanguínea, en el orden de horas, siendo excretado rápidamente por el sistema glomerular de los riñones [89].

Por otro lado, la heterogénea vascularización, flujo de sangre variable y una elevada presión de fluido intersticial presente en los tumores, representan en muchos casos un verdadero desafío en cuanto a la entrada de moléculas por mecanismos de convección y difusión. Sin embargo, moléculas de bajo peso molecular han demostrado una gran capacidad de extravasar el tumor y de lograr una distribución más homogénea [90].

Una de las principales técnicas para obtener moléculas de menor tamaño o para remover uniones no específicas a partir de anticuerpos es a través del uso de enzimas proteolíticas [91]. Los fragmentos pueden ser obtenidos a través de la digestión enzimática del anticuerpo entero con papaína o pepsina, respectivamente.

El tratamiento de una molécula de anticuerpo con pepsina genera el fragmento  $F(ab')_2$ , que posee las dos regiones de unión al antígeno Fab unidas a través de la región bisagra. La papaína, por su parte, escinde la molécula de anticuerpo entre los dominios  $CH_1$  y  $CH_2$  para

producir dos tipos de fragmentos proteicos, dos Fab idénticos que conservan su capacidad de unión al antígeno y uno que cristaliza de forma espontánea, por lo que recibe el nombre de fragmento cristalizante o Fc (ver figura 19) [92].



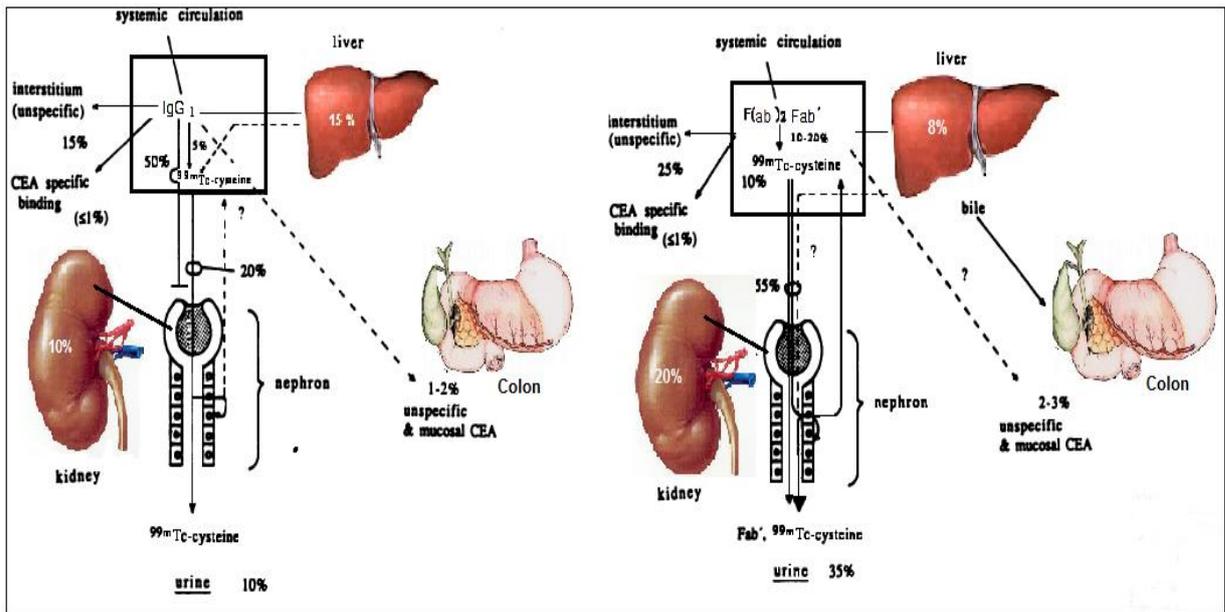
**Figura 19.** a) Obtención de fragmentos Fab y  $F(ab')_2$ ; b) Estructura cristalina del fragmento Fab del Nimotuzumab, en donde se observa la cadena liviana de color naranja y la cadena pesada en verde. (Imagen tomada de [www.inmunologiaenlinea.es](http://www.inmunologiaenlinea.es) y de Cancer Res 2009, vol. 69)

Las ventajas que ofrece la utilización de fragmentos de anticuerpo son:

I) La ausencia del Fc produce un aumento en la cinética de eliminación al no poder interactuar con las células de Kupffer presentes en el hígado encargada de su catabolismo. De esta manera, se elimina también la inmunogenicidad del anticuerpo al no poder activar el sistema inmune presente principalmente en hígado y bazo [93]. La disminución de uniones no específicas también permite mejorar la relación tumor/tejido al aumentar el contraste en el diagnóstico por imágenes [94].

II) Una mayor depuración del torrente sanguíneo en el siguiente orden de velocidad  $Fab > F(ab')_2 > IgG$  aumentando la relación tumor/sangre en un relación ( $>20:1$ ) a 24 h postinyección de un radiofármaco [95].

III) Disminución de la posibilidad de formación de inmunocomplejos (ver figura 20.)



**Figura 20.** Representación esquemática del metabolismo y cinética de captación de algunos órganos para una IgG y su Fab. (Imagen tomada de Cancer Res. 1995, vol. 55)

Se han utilizado los fragmentos de anticuerpos monoclonales en la construcción de inmunotoxinas [96] y en la detección de tumores primarios y sus metástasis, mediante estudios gammagráficos [97]. El uso de F(abs) se ha extendido a diferentes patologías y con diferentes propósitos. A continuación, se detallan algunos ejemplos:

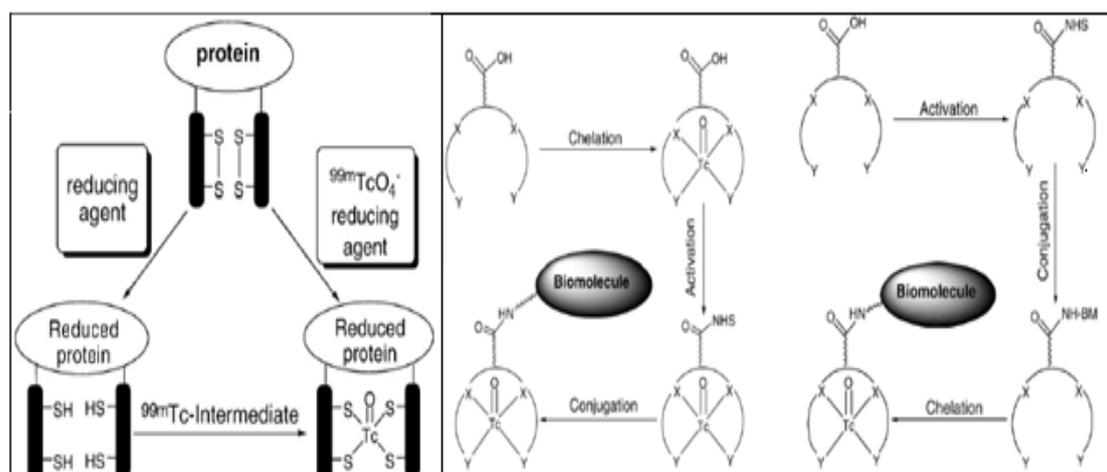
- **Nofetumomab:** fragmento del anticuerpo IgG<sub>2</sub> murino NR-LU-10 dirigido contra la glicoproteína asociada al carcinoma, el cual está marcado con <sup>99m</sup>Tc. Está indicado como agente de diagnóstico por imagen para pacientes con cáncer de pulmón. El Fab deriva de la digestión enzimática y se elimina rápidamente de la circulación, con una vida media en sangre de 1,46 horas. La depuración renal es la principal vía de eliminación constituyendo el 67,7% [98].
- **Arcitumomab:** fragmento obtenido a partir de la digestión con papaína de la IgG<sub>1</sub> anti-CEA-F(ab') (CEA-scan) al que se lo emplea como radiotrazador en la detección de cáncer colorrectal recurrente y especialmente en aquellos casos con niveles ascendentes en suero del antígeno carcinoembrionario (CEA). Se emplea especialmente cuando otras técnicas de imagen convencional son negativas o equívocas. La inmunogammagrafía es, en estos casos, superior a otras técnicas diagnósticas en el seguimiento del cáncer colorrectal [99].
- **Abciximab (Fab c7E3):** fragmento quimérico obtenido a partir de un anticuerpo monoclonal humano-murino e inhibe la agregación plaquetaria al unirse con gran afinidad a la glicoproteína plaquetaria (GP) IIB / IIIA. Ha demostrado una mayor actividad antitrombótica frente a la aspirina o heparina en modelos animales [100].

➤ **Certolizumab pegol:** fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), aprobado en mayo del 2009 como fármaco frente a la artrosis reumatoidea (AR) y la enfermedad de Crohn (EC). La vida media del Fab en la circulación sanguínea se incrementa significativamente debido a que es un Fab peguilado, que incrementa notoriamente su biodisponibilidad [101]. El mismo actúa tanto sobre el TNF- $\alpha$  soluble y el TNF- $\alpha$  unido a la membrana, pero no se une ni fija complemento y no induce toxicidad mediada por células *in vitro*, como consecuencia de la ausencia del fragmento Fc [102].

#### **2.6.4. Estrategias de marcado**

La existencia de una gran diversidad de métodos de marcación ha llevado a la conclusión de que no existe una única manera de radiomarcarse adecuadamente una biomolécula. Las principales estrategias de marcado las podemos agrupar en dos principales categorías: método de marcado directo y marcado indirecto. Este último se divide en método de pre-marcado (quelantes preformados) y método de post-marcado [81]. Para realizar el marcado directo se utilizan agentes reductores capaces de reducir los puentes disulfuro y generar así grupos tioles libres capaces de unirse al Tc. La mayor ventaja del marcado directo es la facilidad con que se lleva a cabo la reacción [103].

El marcado indirecto se puede realizar a través de dos vías, marcado por pre-conjugación y postconjugación. En la pre-conjugación, un quelante bifuncional es radiomarcado antes de ser conjugado a la molécula blanco, con el fin de no exponer dicha molécula a condiciones extremas de temperatura o pH, usadas algunas veces para llevar a cabo el marcado [104-105]. Para el marcado por post-conjugación el quelante bifuncional se conjuga previamente a la molécula blanco y posteriormente se marca el conjugado (ver figura 21).



**Figura 21.** Principales aproximaciones para la marcación de algunos radiofármacos.  
(Imagen tomada de Chem. Rev. 1999, vol. 99)

Para la marcación se recurre generalmente al Cloruro de Estaño (II) como agente reductor, que es comúnmente utilizado en los kits comerciales para la rápida preparación de los radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ . A su vez, el grado en que se lleva a cabo la marcación depende de algunos factores como las condiciones en donde se lleva a cabo, la naturaleza química del agente bifuncional, así como la presencia de oxígeno [106].

Una vez que el  $^{99m}\text{Tc}$  es reducido, se pueden obtener por lo menos cuatro diferentes especies:

- ✓  $^{99m}\text{Tc}$  libre bajo la forma de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , que no ha sido reducido por el agente reductor.
- ✓  $^{99m}\text{Tc}$  reducido que no reaccionó con el quelante bifuncional que se encuentra como  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (también denominado reducido-hidrolizado).

### **2.6.5. Quelantes Bifuncionales y HYNIC**

Los quelantes bifuncionales son moléculas capaces de unirse covalentemente a una molécula blanco y a su vez quelar un metal, con alta estabilidad termodinámica y cinética. Su elección depende principalmente de tres aspectos: la naturaleza, estado de oxidación del metal y de las características de la química de coordinación del mismo. Las características fisicoquímicas del quelante bifuncional también adquieren importancia en cuanto a la depuración sanguínea y en la excreción renal del conjugado [107].

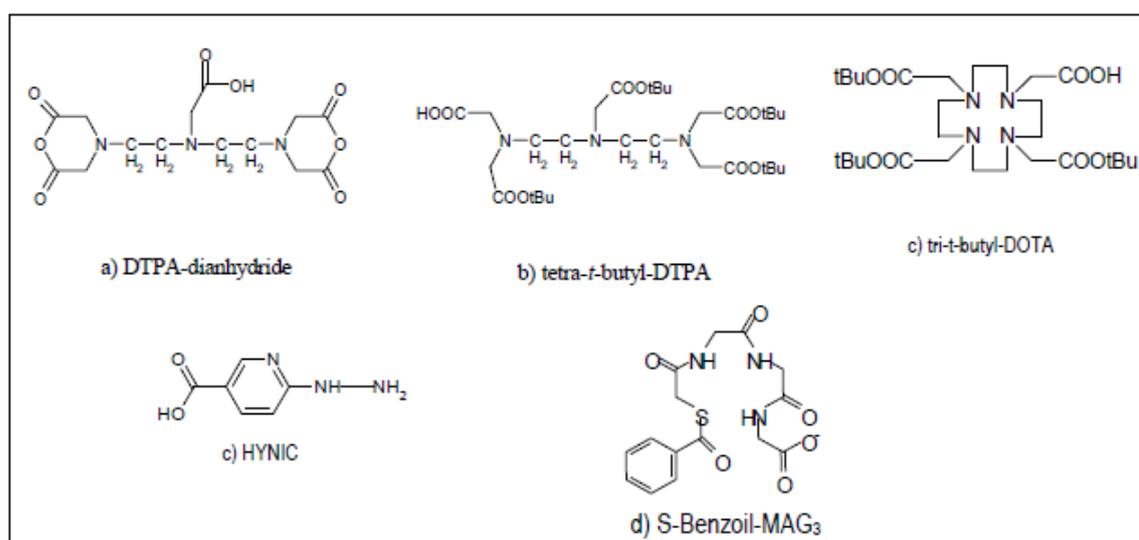
Se han desarrollado una gran diversidad de quelantes bifuncionales con diferentes características y con diferentes propósitos. Algunos de los más utilizados son: el ácido 6-hidrazinonicotínico (HYNIC) reportado por Abrams y cols., el ácido

dietilentriaminopentaacético (DTPA), el ácido 1, 4, 7, 10-tetraazaciclododecano-N, N', N'', N'''- tetra acético (DOTA), entre otros (ver figura 22).

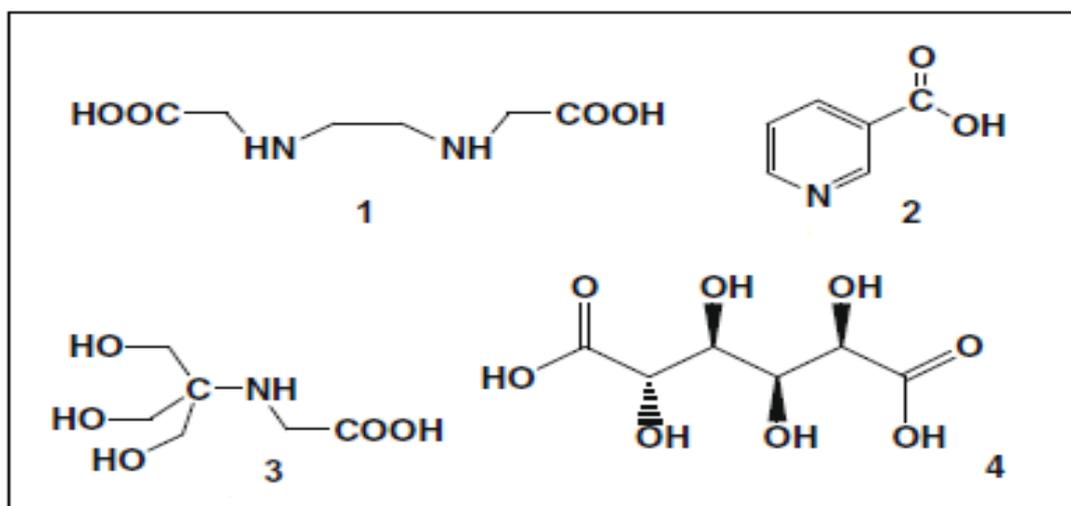
Un quelante bifuncional comúnmente utilizado en la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  para la marcación de anticuerpos y pequeñas biomoléculas es el HYNIC y sus respectivos derivados [108].

La reacción del HYNIC con la biomolécula ocurre por la reacción del grupo éster activado del HYNIC con por ejemplo el grupo  $\epsilon$ -amino de lisinas en anticuerpos, en donde se genera un enlace amida entre ambas moléculas. El HYNIC solamente puede establecer hasta dos enlaces de coordinación con un metal y, por tal motivo, es necesario completar la esfera de coordinación utilizando coligandos adicionales (ver figura 23) [109].

La mayor ventaja que brinda es la gran eficiencia de marcación y la gran estabilidad *in vivo* de los complejos formados con  $^{99m}\text{Tc}$ . La gran diversidad de coligandos permite la modificación de la hidrofiliicidad y farmacocinética de los radioconjugados [110].



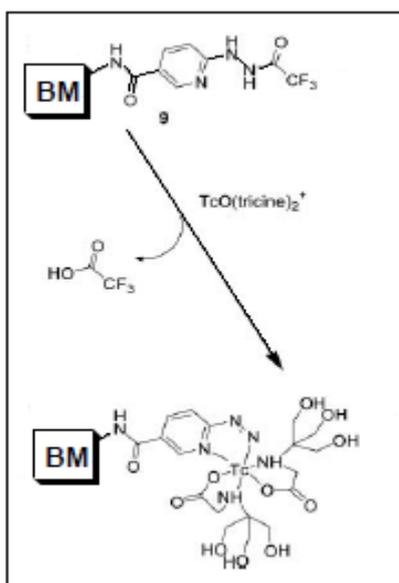
**Figura 22.** Algunos Agentes Quelantes Bifuncionales.  
(Imagen tomada de Bioconjugate Chemistry 1997, vol. 8 ).



**Figura 23.** Coligandos usados con HYNIC: 1) EDDA, 2) Acido Nicotínico, 3) Tricina, 4) Ácido Glucárico. (Imagen tomada de Inorganica Chimica Acta, 2010, vol. 363).

Una desventaja de los conjugados con HYNIC es que pueden descomponerse por acción de la luz, la que produce reacciones de oxidación de los mismos. Otra debilidad del uso del HYNIC es la alta nucleofilia del grupo hidrazino. Cuando es usado en la síntesis de bioconjugados sin protección se producen reacciones indeseadas con electrófilos y hasta con su propio grupo éster, generando la formación de una variedad de productos debido a oligomerización del HYNIC o el bloqueo del mismo por algún contaminante presente [111].

La protección del HYNIC empleando algunas estrategias previene este tipo de reacciones paralelas, sin embargo, la remoción de los grupos protectores muchas veces requiere condiciones muy drásticas. Se ha observado que la protección del HYNIC con ácido trifluoroacético (TFA) permite una marcación directa con  $^{99m}\text{Tc}$  sin la necesidad de exponer el grupo hidrazino y posibilita obtener mayor una mayor eficiencia en la marcación (ver figura 24) [112].



**Figura 24.** Posible mecanismo de desprotección de un bioconjugado de  $^{99m}\text{Tc}$ .  
(Imagen tomada de <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2008/dt/b805110k>)

En el presente trabajo se recurrió a la marcación del anticuerpo hR3 y el fragmento Fab por el método indirecto. Se seleccionó como quelante bifuncional para radiomarcarse el hR3/Fab, el succidinimyl-hidrazinonicotinamida (S-HYNIC) y su versión protegida, el trifluoroacetyl succidinimyl-hidrazinonicotinamida (TFA-HYNIC), usando como coligando Tricina. Dichos conjugados fueron preliminarmente evaluados como agentes de imagen molecular de la expresión del HER1.

## **III. Materiales y Procedimiento**

### **3.1. Obtención y Purificación**

Para llevar a cabo el trabajo experimental se empleó el anticuerpo Nimotuzumab (hR3) CIMAher® (CIMAB S.A.) proporcionado por el Centro de Imagenología Molecular, Ciudad de la Habana.

#### ✓ **Nimotuzumab (hR3)**

La purificación del hR3 se realizó en una columna PD-10, (Amersham Biosciences), la que se equilibró con NaCl 0,9%, y se sembró con la solución de hR3 en no más de 1ml. La elución se realizó con una solución de NaCl 0,9% y se recolectaron fracciones de 1 ml.

Posteriormente, se realizó una dilución 1/20 a la que se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV 1603) a  $\lambda=280$  nm. Se calculó la concentración de cada fracción tomando  $\epsilon_{280} = 1.4$

$$\left( [Pr\ oteína] (mg / mL) = \left( \frac{A_{280} \times factor\ de\ dilución}{\epsilon_{280}} \right) \right)$$

Finalmente, se juntaron aquellas fracciones (no diluidas) que presentaron la mayor concentración de proteína.

### **3.2. Digestión del hR3, purificación y control de calidad**

#### ✓ **Fab-Nimotuzumab (Fab- hR3)**

Luego de obtener el hR3 puro se procedió a su fragmentación con el objetivo de obtener el Fab. Fue digerido con papaína (Sigma-Aldrich) 1mg/ml. La reacción se llevó a cabo en buffer PBS (Mallinckrodt) pH 8, EDTA 0.02 M en relación 1:20 (m/m) Papaína-hR3. La mezcla de digestión se incubó por un periodo de 6 horas a 37 °C, deteniéndose la reacción con Iodoacetamida (Sigma-Aldrich) 0.03 M.

Finalmente, el pH de la mezcla de digestión fue ajustado entre 8,7- 8,9 con Tris base 2M.

#### ✓ **Purificación del fragmento (Fab)**

La mezcla de digestión se concentró y purificó inicialmente con tubos centrífuga (Amersham-biociencias) de 30 kDa. Con el fin de separar el anticuerpo que no fue digerido, se procedió a una segunda etapa de purificación, a través de una cromatografía de exclusión molecular, en columna sephadex-G-50 (Sigma-Aldrich). La elución se realizó con NaCl 0.9%

y se determinó la concentración proteica de cada fracción midiendo diluciones 1/20 en espectrofotómetro a  $\lambda=280$  nm.

Por último, se realizó un tercer paso de purificación mediante una cromatografía de afinidad. Se procedió a pasar la muestra obtenida en el paso anterior a través de una columna de Proteína A (Fisher), equilibrada previamente con buffer PBS pH 8. Se aplicó la muestra y se recolectó el primer mililitro, quedando retenidos fragmentos Fc o anticuerpo sin digerir que no haya sido eliminado en el paso de purificación anterior. Se realizó el mismo procedimiento por duplicado para asegurarnos una mayor eficiencia en la purificación. La concentración final del fragmento fue determinada por absorbancia de una fracción diluida 1/20 a  $\lambda=280$  nm. El valor del coeficiente de absortividad molar para el fragmento (1,4) fue determinado en [www.ca.expasy.org/tools/protparam](http://www.ca.expasy.org/tools/protparam), considerando el contenido de triptófanos, tirosinas y cisteínas.

#### ✓ **Controles de Calidad**

Para verificar la pureza de las muestras obtenidas se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10% (BioRad), usando como referencia la seroalbúmina bovina (BSA~60.000 Da, Sigma), y el hR3 (~150.000 Da). Se realizan controles por HPLC tanto del hR3 como del Fab conjugados y sin conjugar. La identificación final de la muestra fue realizada por Espectrometría de masas en el equipo 4800 MALDI-TOF/TOF (ABi MDS Sciex) del Instituto Pasteur, Montevideo, Uruguay.

### **3.3. Derivatización y purificación de ambos conjugados**

#### ✓ **Derivatización del hR3 y Fab**

Por último, se realizó la conjugación del hR3 y del Fab obtenido. Ambas moléculas fueron derivatizadas con HYNIC. Se ensayaron dos derivados, 3-N-Hidroxisuccinimidil carbonil-6-hidrazinopiridina clorhidrato (S-HYNIC) y el análogo trifluoroacetilado (TFA-HYNIC), ambos sintetizados en nuestro laboratorio.

En primer lugar, la solución de hR3 se le adicionó  $\text{NaHCO}_3$  1 M para ajustar su pH a 8,5. Se adicionó un exceso 5 M de HYNIC disuelto en DMSO (J. T. Baker). La mezcla se incubó en la oscuridad por 30 minutos a  $T_{\text{ambiente}}$ .

Para separar el HYNIC que no reaccionó, las mezclas de reacción fueron purificadas por cromatografía de exclusión molecular en columnas G-25 (PD-10) y G-50, para el hR3 y Fab respectivamente, eluyendo con buffer acetato de sodio, 0.15 M pH= 6.4. Se recolectaron

fracciones y se midió la absorbancia de diluciones 1/20 para determinar la concentración de la muestra ( $\lambda=280$  nm,  $\epsilon_{280} = 1.4$ ).

✓ **Almacenamiento del conjugado HYNIC-hR3/HYNIC-Fab**

Una vez purificadas, las muestras fueron fraccionadas y liofilizadas en liofilizador (HETO) y almacenadas a 4°C.

**3.4. Marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  del conjugado HYNIC-hR3/HYNIC-Fab**

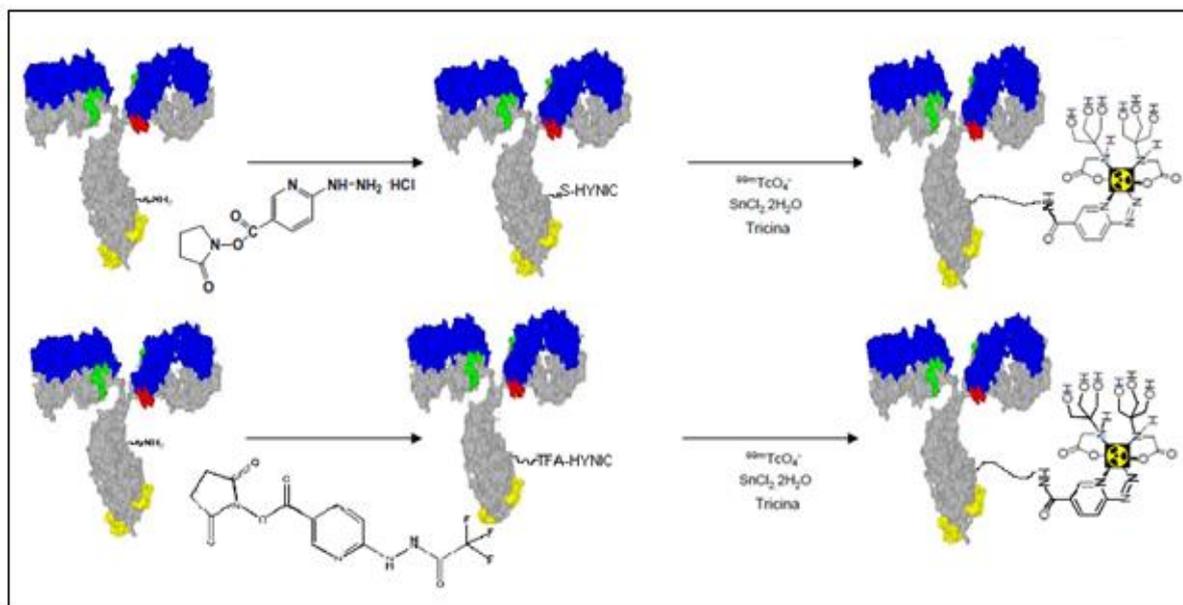
✓ **Solución de  $\text{SnCl}_2$ /Tricina**

Para realizar la marcación de los conjugados es necesario previamente reducir el pertechnetato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) obtenido del generador (Tecnonuclear) a un estado de oxidación más bajo. Para ello, se utilizó  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (J. T. Baker), en medio ácido pH= 4.5 y una cantidad adecuada de Tricina (Sigma) para que funcione como coligando, estabilizando el conjugado al completar la esfera de coordinación. Marcación de los conjugados

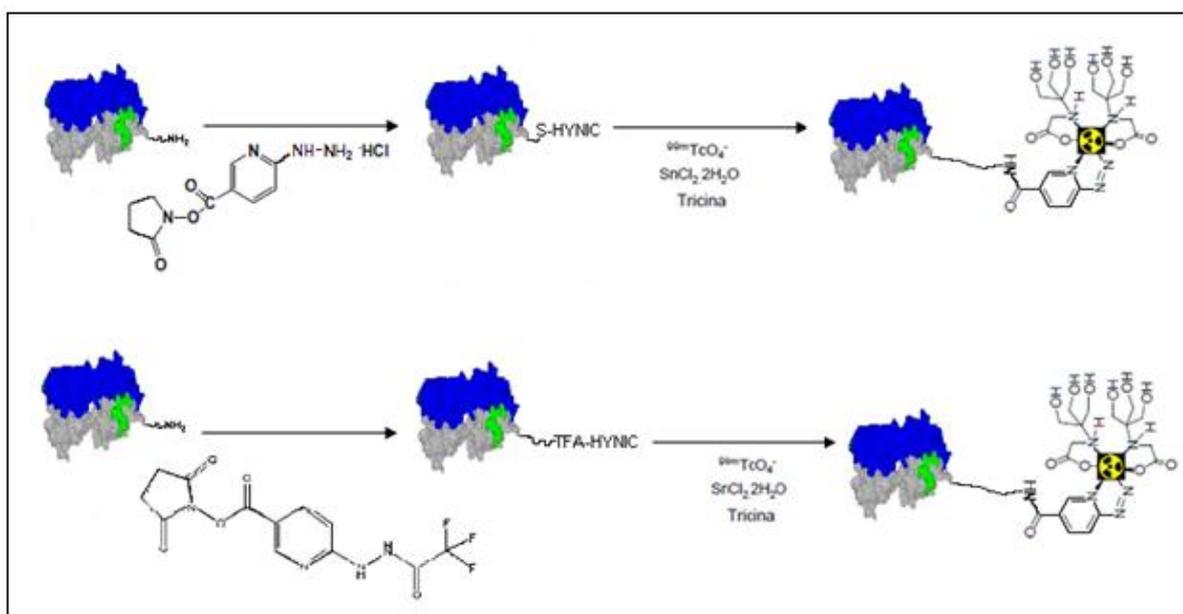
El proceso de marcación de los conjugados con  $^{99m}\text{Tc}$  se realizó en dos etapas. Para ello, se prepararon dos soluciones en dos viales distintos (vial A y vial B). En el vial A se disolvieron 39  $\mu\text{mol}$  de Tricina en 0.8 mL de agua y se adicionó 0.05 mL de HCl 2.0 M para acidificar la solución, (solución 8,2 mg/mL), mientras que en el vial B se disolvieron 40  $\mu\text{mol}$  de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 0.5 mL de HCl 2.0 M (solución 18 mg/mL), de los cuales 50  $\mu\text{L}$  fueron adicionados a la solución de Tricina. Finalmente, el volumen se ajustó a 10 mL con NaCl 0.9% y se agregó a la mezcla HYNIC-hR3 y HYNIC-Fab en una relación molar 1:1. Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con  $\text{N}_2$  gas (AGA).

La marcación se realizó agregando inmediatamente  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  hasta un máximo de 1 mL, con una actividad de 37MBq por miligramo de HYNIC-Fab o HYNIC-hR3 y se incubó por 30 minutos a  $T_{\text{ambiente}}$  (ver figura 25 y 26).

Las mediciones de actividad de los diferentes conjugados marcados se midieron en un calibrador de dosis (Carpintec, CRC7).



**Figura 25.** Esquema de la derivatización del hR3 con S-HYNIC/TFA-HYNIC y su posterior marcación con <sup>99m</sup>Tc.



**Figura 26.** Esquema de derivatización del Fab con S-HYNIC/TFA-HYNIC y la posterior marcación con <sup>99m</sup>Tc.

### 3.5. Controles

La pureza radioquímica (%PRQ) del marcado fue cuantificada mediante el empleo de sistemas cromatográficos, los cuales se detallan en la Tabla 2, para determinar impurezas como  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre y  $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ .

Se realizaron, además, controles por HPLC (Agilent Serie Infinity 1200 equipado con detector GABI Star) del anticuerpo entero conjugado ( $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-hR3) y del fragmento ( $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab), mediante detección gamma y UV ( $\lambda = 280$  nm). Para esto, se realizó un programa isocrático con buffer fosfato 0.01M, pH 7.0 y flujo 1 mL/min, empleando una columna de exclusión molecular (Waters, 300 SW 7,5 x 300 mm).

**Tabla 2.** Diferentes controles cromatográficos utilizados para determinar las impurezas radioquímicas.

<u>Control</u>	<u>Fase Estacionaria</u>	<u>Fase Móvil</u>	<u>Rf</u>	<u>Molécula</u>
1	ITLC-SG (Varian)	NaCl 0.9%	0.0	$^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC- hR3/ $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab y $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			1.0	$^{99m}\text{Tc}$ -tricina, $^{99m}\text{TcO}_4^-$
2	Watman 1 (Whatman International Ltd.)	MEK	0.0	$^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC- hR3/ $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab, $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ y $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina
			1.0	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
3	ITLC-SG impregnada en BSA (Varian)	EtOH-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O (2:1:5)	0.0	$^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$
			0.6-1	$^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC- hR3/ $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab, $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina y $^{99m}\text{TcO}_4^-$

### **3.6. Estabilidad del marcado**

Como indicador de la estabilidad del radiomarcado a las dos semanas de la conjugación, se realizaron dos estudios, un ensayo en solución que se controló a las 2, 4 y 24 h y un ensayo *in-vitro* de transquelación del  $^{99m}\text{Tc}$  en diferentes soluciones. Estos estudios se monitorearon mediante cromatografía en capa fina a 1,4 y 24 h a 37 °C.

En primer lugar, se estudió en solución de NaCl 0.9 % con un agente de competencia para el radionucleido como lo es la L-Cisteína, evaluada a través de tres concentraciones diferentes: 0.1, 0.01, 0.001 mg/mL.

### **3.7. Estabilidad de los conjugados**

Se realizó el estudio de la estabilidad del hR3 conjugado con TFA-HYNIC y S-HYNIC durante tres semanas, para lo cual se procedió a su marcación y su control a las 2, 4, y 24 h mediante HPLC e ITLC.

### **3.8. Biodistribución**

La evaluación biológica *in-vivo*, tanto del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-hR3 como del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab se llevó a cabo a través de la realización de estudios de biodistribución a 1h. (n=3), 4 h (n =3), 24 h (n =3) en ratones normales Balb/c y con adenocarcinoma mamario espontáneo (tumor  $\sim 1\text{cm}^3$ ), proporcionados por el Laboratorio de experimentación animal del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN). Las mediciones de actividad para todas las biodistribuciones se llevaron a cabo en un Contador de centelleo sólido de pozo con detector de cristal de NaI (tl) de 3" x 3" asociado a un analizador monocanal (ORTEC).

Por último, es importante destacar que todos los ratones empleados fueron mantenidos bajo normas de control vigentes y avaladas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

## **IV. Resultados**

#### 4.1. Obtención y Purificación

Previo a la conjugación del anticuerpo con el HYNIC fue necesario eliminar excipientes que puedan interferir con procesos posteriores. Para esto, se realizó una purificación por exclusión molecular en columna PD10 del anticuerpo (ver figura 27).

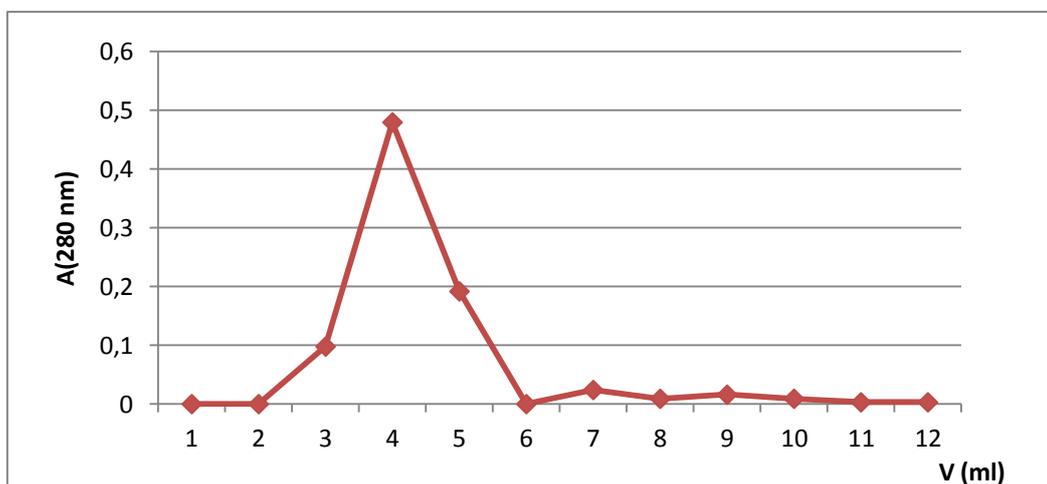


Figura 27. Perfil de elución del hR3. Se recuperó más del 85% del total de anticuerpo sembrado.

#### 4.2. Digestión del hR3, purificación y control de calidad

Para la obtención del Fab, el hR3 fue incubado con papaína y luego la mezcla de digestión fue purificada por columna G-50. El rendimiento de la digestión fue de un 75 % (ver figura 28).

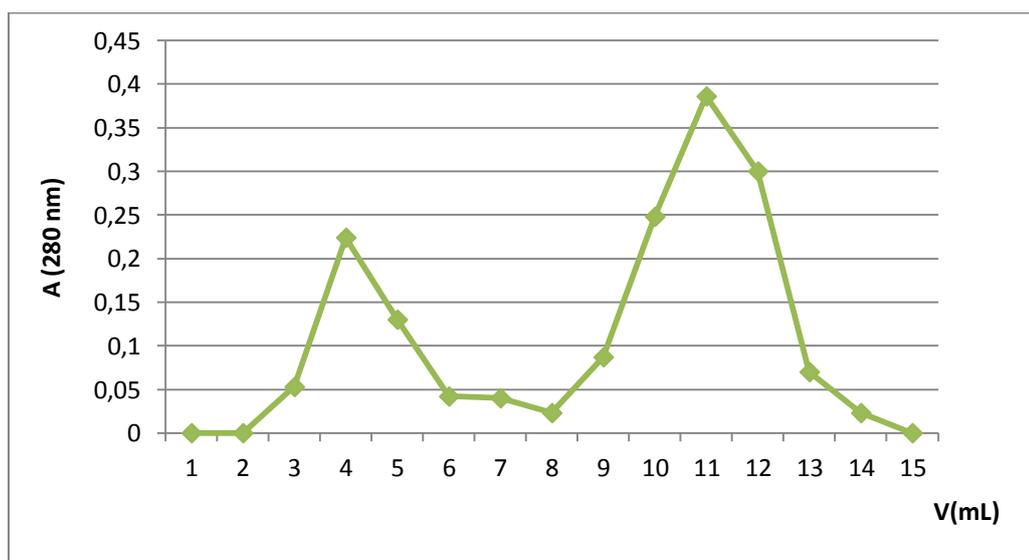
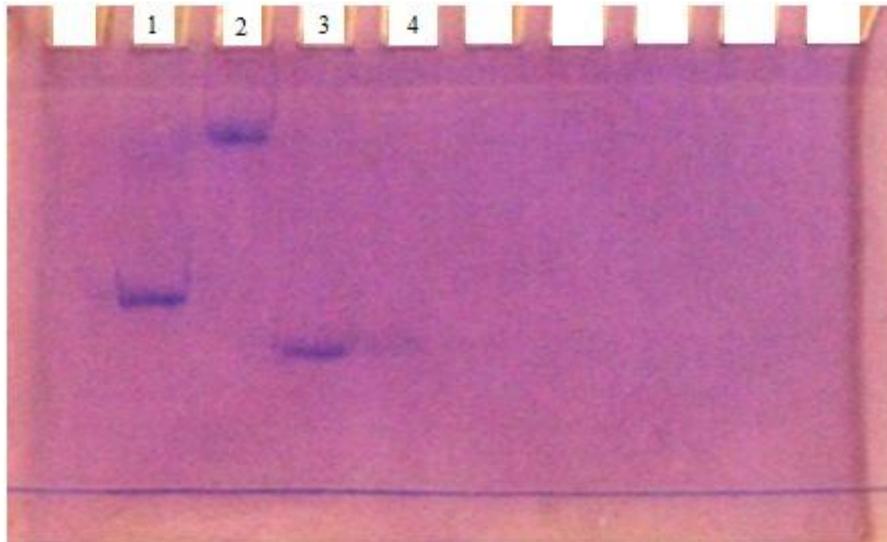
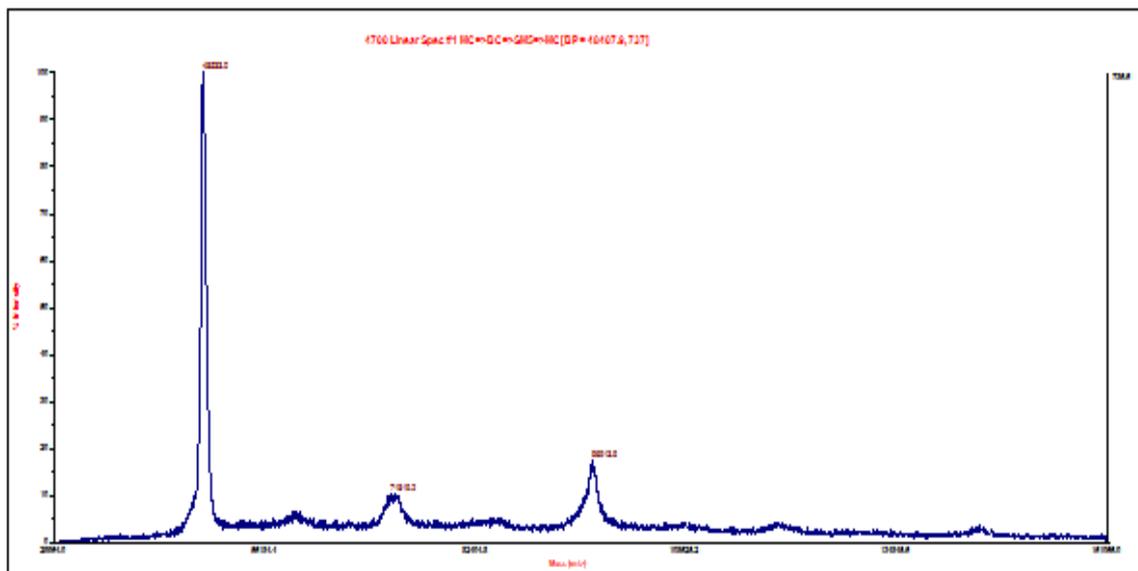


Figura 28. Purificación de la mezcla de digestión por columna Sephadex G-50. El primer pico corresponde al hR3 y el segundo al Fab.

Para comprobar la pureza del fragmento obtenido luego de la digestión se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10%, en la que se observa una única banda en el carril 3 de aproximadamente 48 kDa (ver figura 29). La identidad del fragmento se verificó finalmente mediante espectrometría de masas en donde se observa una señal correspondiente al Fab de aproximadamente 48407 Da (ver figura 30). Finalmente, se determinó que la recuperación del Fab en todo el proceso fue del 85 %.



**Figura 29.** SDS-PAGE 10%. Se observa, carril 1: BSA (~60000 Da), carril 2: hR3 (~150000Da), carril 3: Fab (~48000Da) y carril 4: Fab-HYNIC (~48000Da).

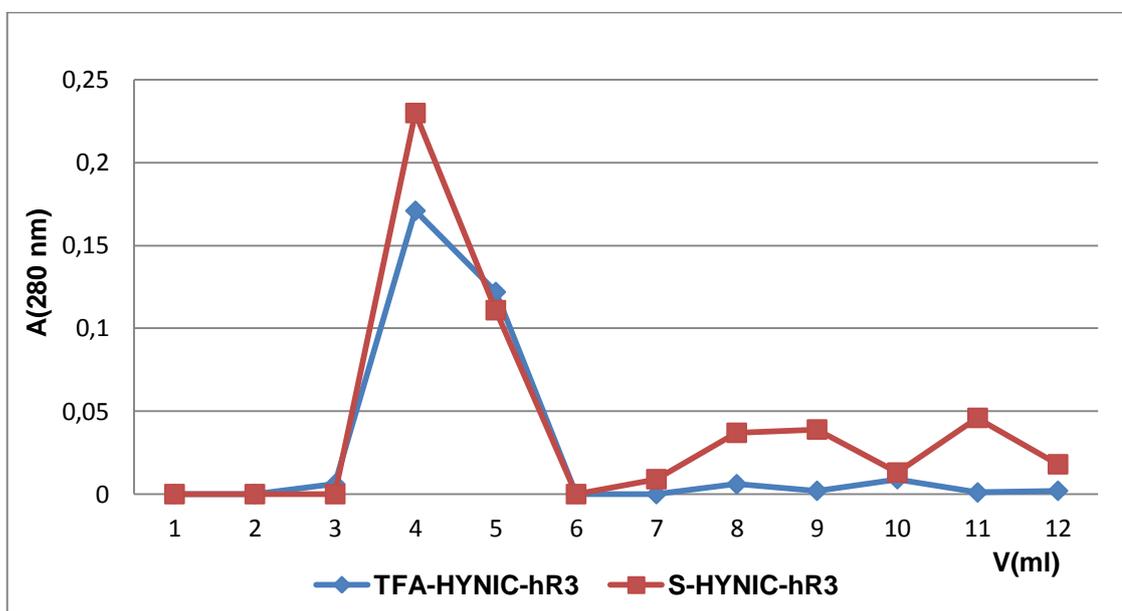


**Figura 30.** Maldi TOF/TOF del Fab purificado donde se observa la señal correspondiente al Fab de aproximadamente 48000 Da.

### 4.3. Derivatización y purificación de ambos conjugados

En la reacción de conjugación, los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina del hR3 y del respectivo Fab reaccionan con el carbono carbonílico del éster del HYNIC, que es altamente electrofílico. La derivatización fue verificada por MALDI TOF/TOF visualizándose un pico para el conjugado de 48565 Da, lo cual podría indicar la presencia de una molécula de HYNIC por molécula de Fab.

Con el fin separar los conjugados del S-HYNIC libre y TFA-HYNIC respectivamente, se realizó una filtración por columna PD-10. Se recuperó más del 75% del hR3 (ver figura 31) y más del 80% de la cantidad de fragmento inicial conjugado.



**Figura 31.** Perfil de elución del hR3 conjugado a TFA-HYNIC y del hR3 conjugado a S-HYNIC.

### 4.4. Marcación con $^{99m}\text{Tc}$ del conjugado HYNIC- hR3/HYNIC-Fab

La derivatización tanto del hR3y del Fab con HYNIC se realizó de manera rápida, sencilla y eficiente. Posteriormente, los respectivos conjugados (HYNIC-Fab, HYNIC-hR3) fueron marcados con  $^{99m}\text{Tc}$  a temperatura ambiente con una actividad específica de 37 MBq por miligramo, resultando en una eficiencia de marcación de  $80 \pm 0,5\%$  y del  $82 \pm 4,0\%$  respectivamente antes de la purificación. Las posibles impurezas  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  libre y  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  fueron determinadas por los sistemas cromatográficos descritos. Para el conjugado del fragmento la  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina fue de un 10,0%, el  $^{99m}\text{TcO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  fue de un 10,5% y que no se encontró pertecneciato libre. Para el conjugado

S-HYNIC-hR3 la  $^{99m}\text{Tc}$ -Tricina fue del 9,6% y el  $^{99m}\text{TcO}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  fue de un 8,9% y para TFA-HYNIC-hR3 8,3% y 4,0%, respectivamente.

#### 4.5. Estabilidad del marcado

Se realizaron dos estudios de estabilidad del marcado, uno para S-HYNIC-hR3 y otro para TFA-HYNIC-hR3 en solución a 2, 4, y 24 h a 37°C, empleando una relación 7/9 de Tricina:  $\text{SnCl}_2$  a las dos semanas de conjugación. En la figura 32 se aprecia una alta estabilidad con una pureza radioquímica mayor al 92% para ambos conjugados a las 24 h.

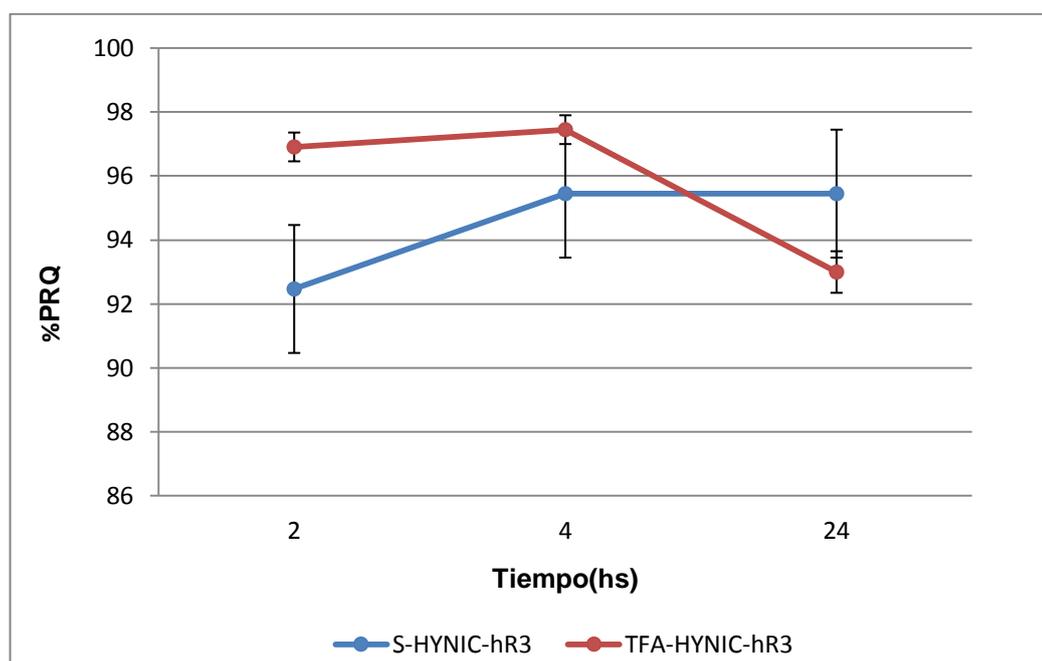


Figura 32. Estabilidad *in vitro* de los conjugados  $^{99m}\text{Tc}$ -S-HYNIC y  $^{99m}\text{Tc}$ -TFA-HYNIC.

A su vez, estos controles coincidieron con los perfiles de HPLC obtenidos (Figuras 33 y 36) tanto con detección gamma como con detección UV, en los cuales se observa un pico correspondiente al conjugado y un pico menor correspondiente al perteneciato (visible en el detector gamma).

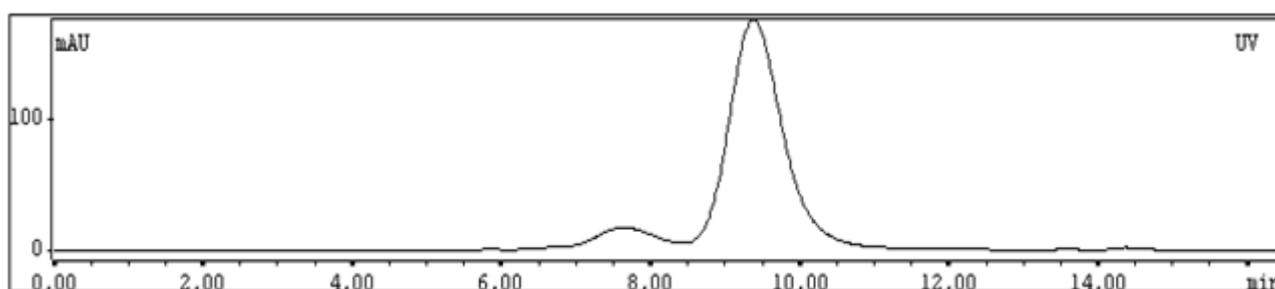
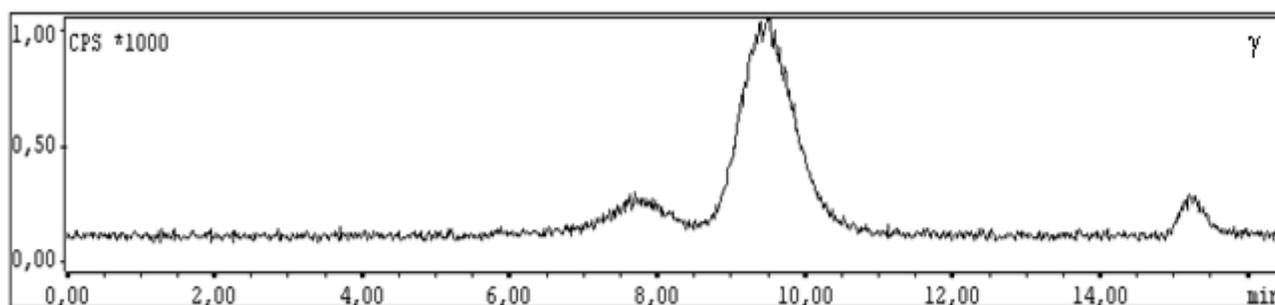
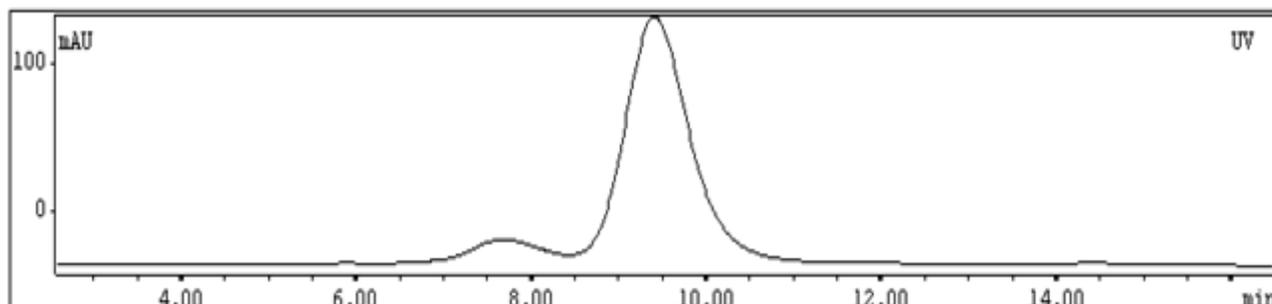


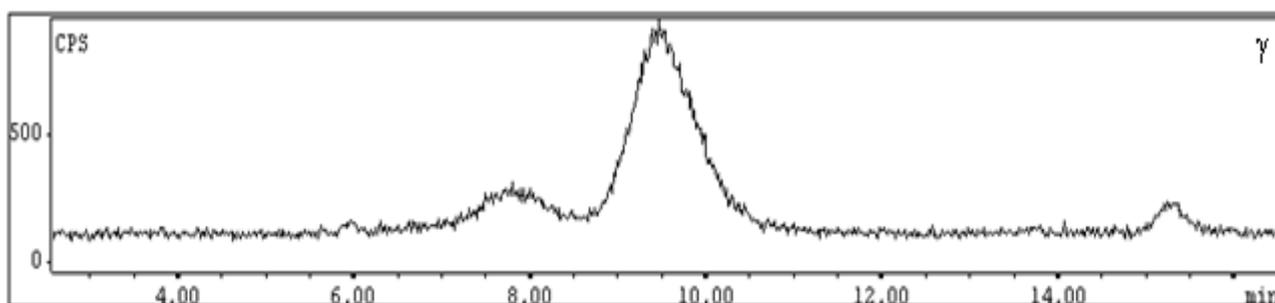
Figura 33. Espectro UV obtenido por HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -TFA-HYNIC-hR3 a las 24 h en solución.



**Figura 34.** Espectro de HPLC obtenido por detección gamma de  $^{99m}\text{Tc}$ -TFA-HYNIC-hR3 a las 24 h en solución.



**Figura 35.** Espectro UV obtenido por HPLC de  $^{99m}\text{Tc}$ -S-HYNIC-hR3 a las 24 h en solución.



**Figura 36.** Espectro de HPLC obtenido por detección gamma de  $^{99m}\text{Tc}$ -S-HYNIC-hR3 a las 24 h en solución.

Como segundo indicador de la estabilidad del radiomarcado de S-HYNIC-hR3 y TFA-HYNIC-hR3 se realizó un estudio *in-vitro* para evaluar la transquelación del  $^{99m}\text{Tc}$  en diferentes soluciones a la tercera semana de la conjugación. Estos estudios se controlaron por cromatografía luego de 1, 4 y 24 h de incubación a 37°C. En primer lugar, se estudió en solución de NaCl 0.9% y luego se utilizaron concentraciones crecientes (0.001, 0.01, 0.1 y 1 mg/mL) de L-Cisteína como agente de competencia (ver tabla 3).

**Tabla 3.** Ensayo de estabilidad de los radiomarcados (S-HYNYC y TFA-HYNYC).

		NaCl 0.9 %	0.001 mg/ml L-Cys	0.01 mg/ml L-Cys	0.1 mg/ml L-Cys	1 mg/ml L-Cys
% PRQ conjugado 1h	S-HYNYC-hR3	78 ± 4	78 ± 3	79 ± 4	78 ± 2	73 ± 4
	TFA-HYNYC-hR3	75 ± 4	76 ± 3	76 ± 3	75 ± 3	65 ± 6
% PRQ conjugado 4h	S-HYNYC-hR3	72 ± 2	72 ± 3	71 ± 3	69 ± 2	66 ± 3
	TFA-HYNYC-hR3	70 ± 3	71 ± 3	69 ± 2	70 ± 2	68 ± 2
% PRQ conjugado 24h	S-HYNYC-hR3	60 ± 5	59 ± 4	59 ± 3	57 ± 2	55 ± 5
	TFA-HYNYC-hR3	61 ± 6	60 ± 3	56 ± 2	56 ± 2	53 ± 4

Los estudios de estabilidad *in-vitro* para el sistema  $^{99m}\text{Tc}$ -S-HYNYC-hR3 en solución de NaCl 0.9% a 37°C muestran que un 78% del  $^{99m}\text{Tc}$  permanece unido al anticuerpo luego de 1h de incubación, y para el conjugado  $^{99m}\text{Tc}$ -TFA-HYNYC-hR3 un 75%. Respecto a la transquelación del  $^{99m}\text{Tc}$  con concentraciones de L-Cisteína los resultados muestran que hasta un 73% y 65% respectivamente del  $^{99m}\text{Tc}$  permanece unido al anticuerpo luego de 1 h. alcanzando finalmente luego de 24 h. una pureza de 55% y 53% tanto para el S-HYNYC como para el TFA-HYNYC.

#### 4.6. Estabilidad de los conjugados

Se evaluó la estabilidad de S-HYNYC-hR3 y TFA-HYNYC-hR3 estando ambos almacenados en solución a 4°C. La estabilidad de los conjugados se estudió por tres semanas seguidas luego de realizado. Los datos se detallan como PRQ (Tabla 4). La PRQ para ambos conjugados disminuye hasta un 75-78% a las tres semanas de la derivatización.

**Tabla 4.** Estabilidad en el tiempo de los conjugados hR3-HYNYC en solución a 4° C.

Tiempo (días)	% PRQ	
	S-HYNYC-hR3	TFA-HYNYC- hR3
7	90 ± 4	92 ± 5
14	86 ± 2	92 ± 2
28	78 ± 5	75 ± 6

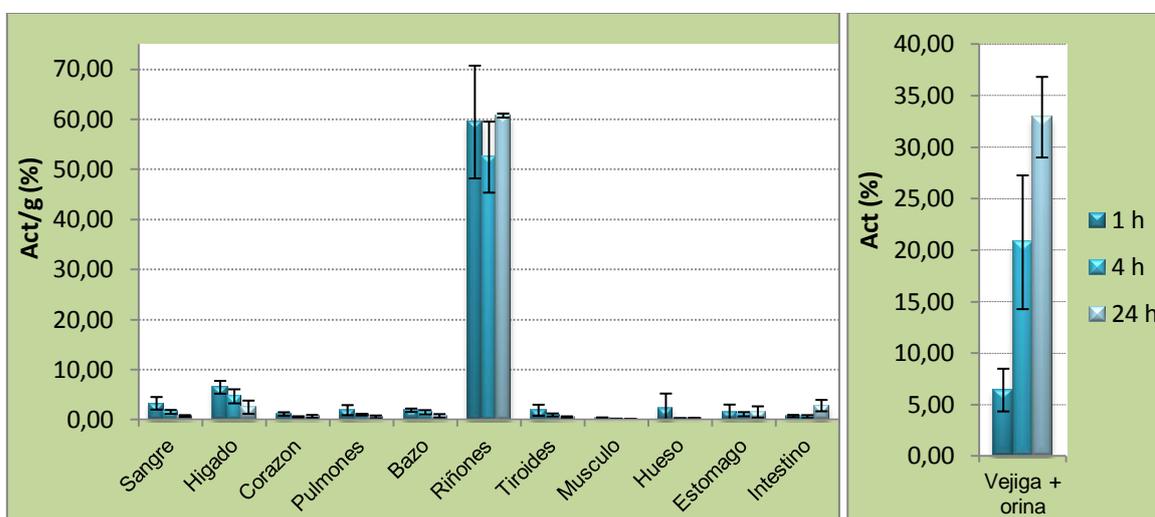
#### 4.7. Biodistribuciones

Para realizar la comparación se emplearon las biodistribuciones realizadas con el anticuerpo hR3 entero en ratones normales y con adenocarcinoma, llevadas a cabo en el

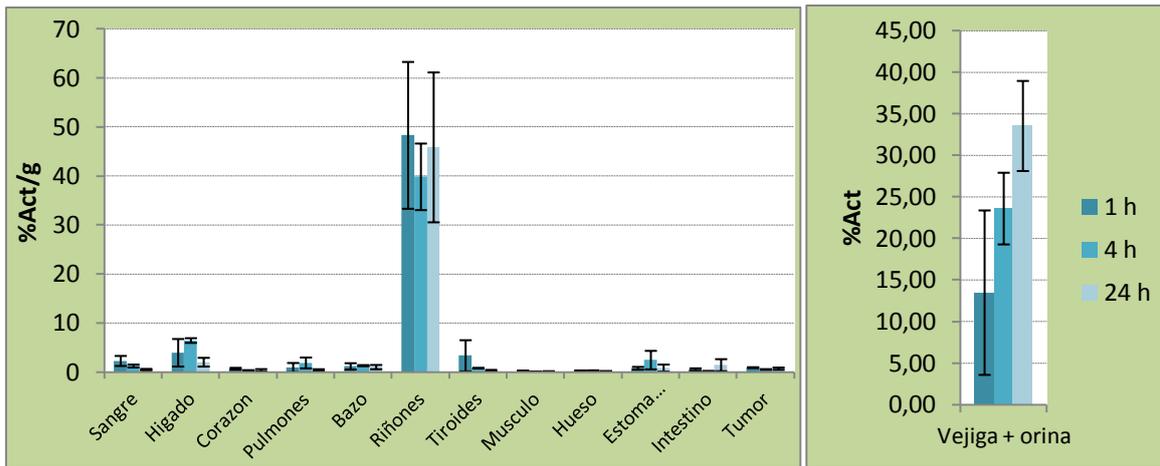
trabajo de tesis *Marcación y evaluación biológica de un anticuerpo anti-EGFR con <sup>99m</sup>Tc como potencial radiofármaco de diagnóstico* de María Fernanda García Melián.

Las biodistribuciones realizadas en ratones sanos para el caso del Fab muestran una rápida depuración sanguínea con alta eliminación renal. Fue posible observar una leve metabolización hepática 1 h post inyección que fue de  $6.4 \pm 1.3$ , la cual disminuye a las 24 h a  $2.4 \pm 1.3$  (%Act/g). No se aprecian captaciones importantes a nivel de los órganos y tejidos restantes (ver figura 37). Las biodistribuciones de los ratones con adenocarcinoma mamario espontáneo registraron un aumento de la captación tumoral con el tiempo y una relación tumor/músculo que se duplicó de  $3.8 \pm 0.1$  hasta  $6.3 \pm 2.0$ , a las 24 h. La relación tumor/sangre también aumentó considerablemente a las 24 h,  $1.6 \pm 1.0$  (ver figuras 38 y 39).

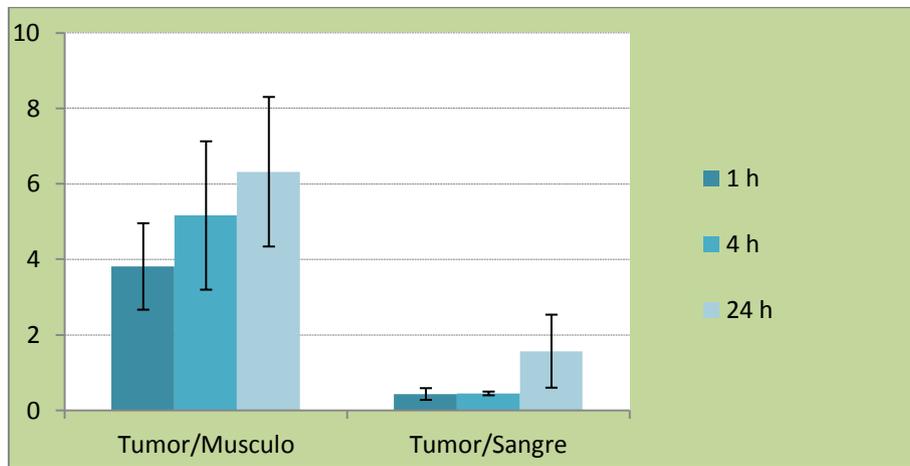
Al comparar los datos obtenidos a partir del Fab con los datos obtenidos con el hR3 entero se aprecia una lenta cinética de depuración a nivel sanguíneo para el Ac entero  $10,77 \pm 1,56$ , en cambio para el Fab alcanza un valor de  $0,68 \pm 0,19$ , a las 24 h (%Act/g) (ver figura 40). No se aprecia una captación tumoral significativa para el Fab con respecto al Ac (ver figura 41). En cambio, el fragmento mostró una alta eliminación renal observándose un  $32,89 \pm 3,91$ , porcentaje de actividad en orina a las 24 h luego de la administración del agente (ver figura 42).



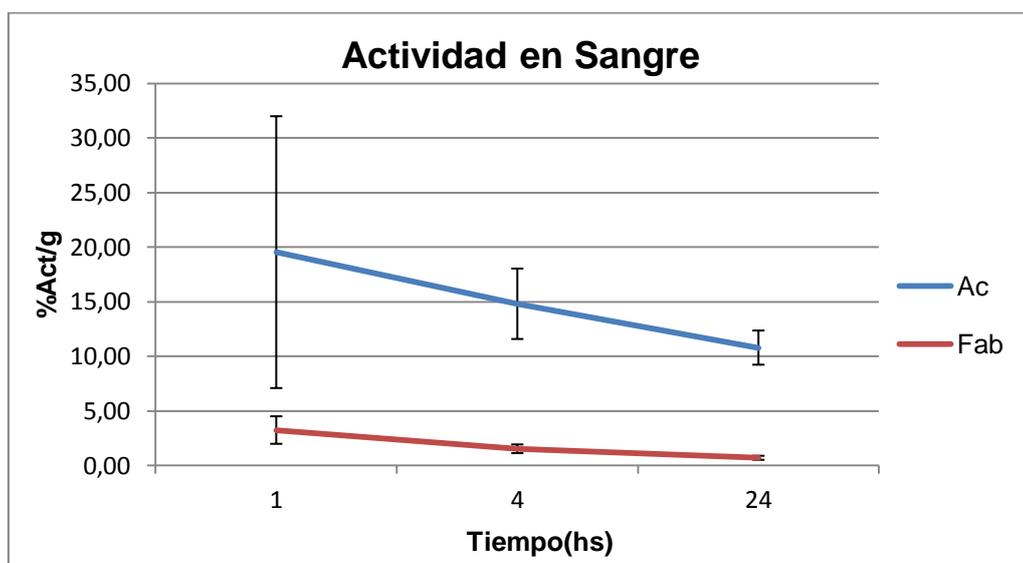
**Figura 37.** Biodistribuciones de <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Fab en ratones CD-1 normales a la 1, 4 y 24 h postinyección.



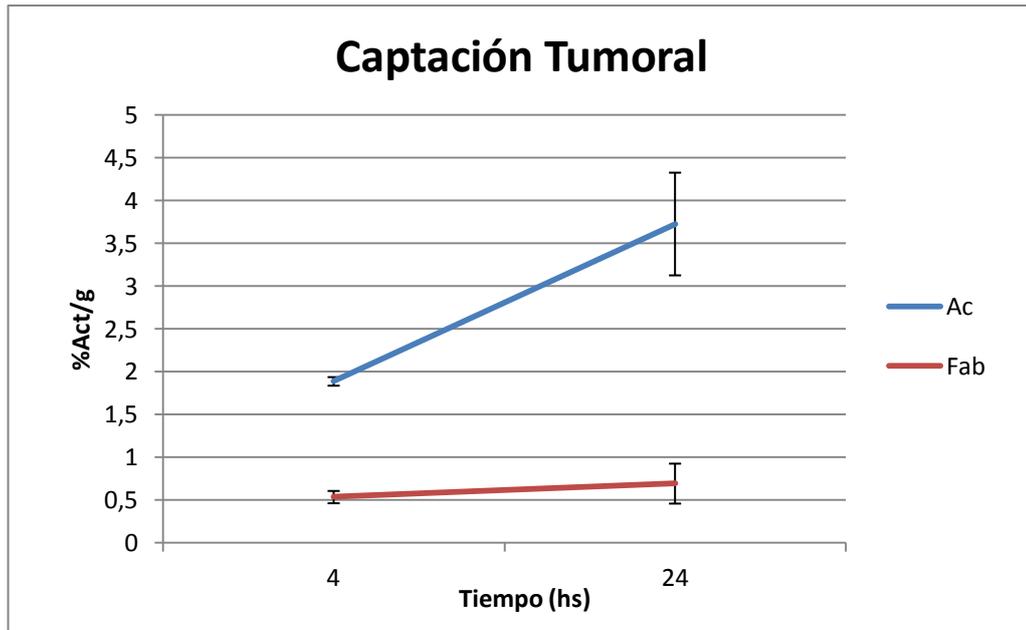
**Figura 38.** Biodistribuciones del <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Fab en ratones hembra CD-1 con adenocarcinoma mamario espontaneo a la 1, 4 y 24 h post inyección.



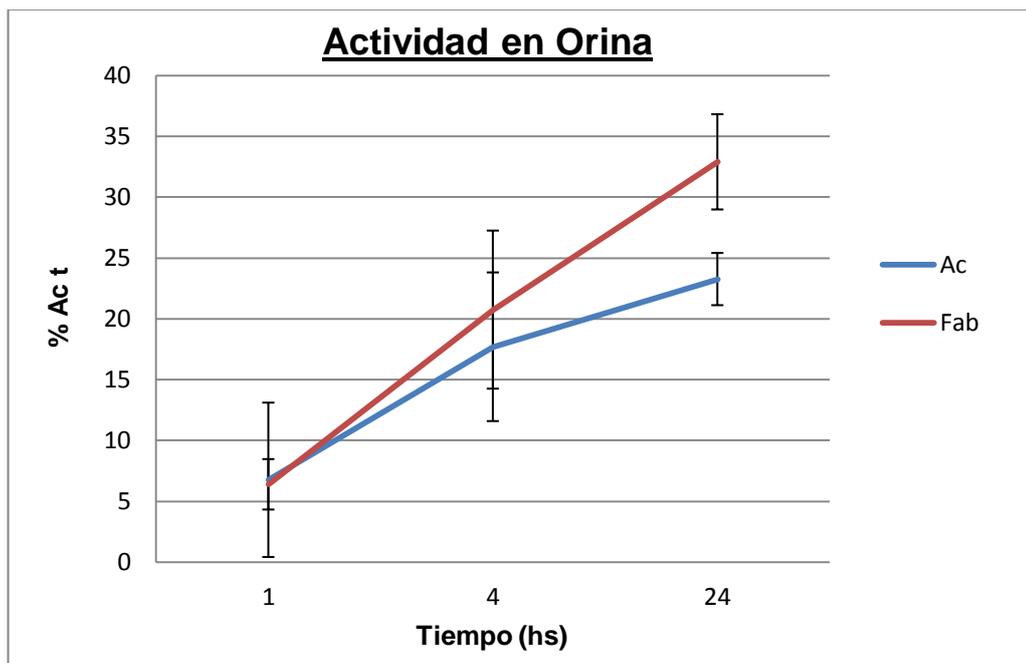
**Figura 39.** Relación Tumor/Músculo y Tumor/Sangre obtenidas a partir de biodistribuciones de <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Fab a la 1, 4 y 24 h postinyección en ratones hembra CD-1 con adenocarcinoma mamario espontaneo (n=3).



**Figura 40.** Depuración sanguínea para los conjugados HYNIC-hR3 y HYNIC-Fab.



**Figura 41.** Nivel de captación a nivel tumoral para los conjugados HYNIC-hR3 y HYNIC-Fab.



**Figura 42.** Actividad en orina para los conjugados HYNIC-hR3 y HYNIC-Fab.

## **V. Discusión**

Actualmente, desarrollar agentes para imagen molecular por centellografía, SPECT o PET, capaces de ser específicos para el cáncer, son de gran beneficio para el diagnóstico, estadificación y seguimiento de dicha enfermedad. En la búsqueda de agentes específicos para el cáncer de mama uno de los blancos moleculares sobre el que se han dirigido varios esfuerzos es el EGFR/ HER1. Es así que uno de los objetivos planteados en este trabajo ha sido la marcación del anticuerpo hR3 y del fragmento obtenido a partir del mismo con el radionucleido  $^{99m}\text{Tc}$ , mediante el empleo del quelante bifuncional HYNIC y su posterior comparación como posibles agentes para su uso en imagenología del cáncer de mama.

La obtención de fragmentos a partir de anticuerpos monoclonales es una estrategia actualmente empleada con el objetivo de mejorar la captación por parte del tumor mejorando la relación tumor/tejido necesaria para un mejor contraste, así como la mejora en la depuración sanguínea (farmacocinética) la cual favorece tanto dicha relación como una menor exposición a la radiación de los pacientes.

Es sabido que los EGFR/HER1 se encuentran sobreexpresados en el tumor de mama así como en algunos cánceres de cabeza y cuello, lo que permite utilizarlos como dianas de estos radiotrazadores.

En el presente trabajo, se obtuvo el fragmento Fab del anticuerpo hR3 mediante digestión con papaína. Aunque este método sea ampliamente utilizado para la obtención de Fabs, los diferentes tipos de inmunoglobulinas hacen que se deba optimizar la técnica de digestión para cada tipo de anticuerpo. Para este anticuerpo se obtuvo un rendimiento de fragmentación superior al 70%.

Una vez obtenido el fragmento fue purificado y luego derivatizado con el agente quelante bifuncional HYNIC. Dicho agente es muy utilizado actualmente en las marcaciones de proteínas y pequeñas biomoléculas con  $^{99m}\text{Tc}$ .

Se trabajó con dos diferentes derivados del agente bifuncional HYNIC, uno de los cuales se hallaba protegido, el TFA-HYNIC. No hubo una diferencia significativa ni en la marcación de los conjugados ni en los estudios de estabilidad y según se evaluó la desprotección se da efectivamente en las condiciones de marcado establecidas para este experimento.

Se utilizó para todas las marcaciones Tricina como coligando, que ocupa los sitios restantes que no han sido ocupados por el HYNIC. Se ensayó una relación 7/9 de agente reductor/coligando para obtener el  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-hR3,  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab con una PRQ superior al 90%. Esto fue determinado a través de los sistemas cromatográficos seleccionados: HPLC, ITLC-SG, Whatman 3 m e ITLC-SG impregnada en BSA.

La marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  a través de HYNIC se realizó en condiciones suaves y a temperatura ambiente cuidando de no afectar la integridad de las biomoléculas. Los rendimientos de marcación hacen necesaria la purificación del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab para sus estudios posteriores.

La optimización de las condiciones de marcado de un fragmento es mayormente compleja en relación a un anticuerpo entero. Por lo tanto, se debe ser muy cuidadoso ya que hay menos cantidad de sitios de unión de HYNIC y se podría afectar la unión del fragmento por el HER1, si alguno de estos sitios se situara cercano a la región de reconocimiento específico.

Los estudios de biodistribución para el Fab en comparación con el hR3 mostraron una rápida depuración sanguínea con eliminación renal fundamentalmente, y no se visualizó captación importante a nivel de los órganos normales.

Si bien no hubo importantes diferencias en la captación tumoral a diferentes tiempos, fue posible observar una alta relación tumor/músculo de  $6.3 \pm 2.0$  y una relación tumor/sangre que aumentó considerablemente a las 24 h.

En este trabajo fue posible evaluar preliminarmente un tipo de estrategia de diagnóstico por imagenología molecular, que apunta a la reducción del tamaño del agente blanco específico, con el fin de lograr una mejor calidad del estudio en cuestión.

## **VI. Conclusión**

En el presente trabajo se obtuvo el anticuerpo hR3 y el fragmento conjugado con S-HYNIC y TFA-HYNIC. En lo que respecta al  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab se pudo obtener de manera eficiente y estable en solución, con pureza radioquímica superior al 90% durante 24 h. Ambos fueron controlados por diferentes sistemas cromatográficos de manera rápida y sencilla.

El estudio de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-Fab mostró resultados preliminares importantes que permitirán seguir estudiándolo como posible agente de diagnóstico de tumores que sobreexpresan HER1.

El empleo del HYNIC protegido permitirá trabajar de manera efectiva al ver que las condiciones de marcación son adecuadas para la desprotección.

Etapas siguientes de esta investigación incluirán la evaluación del potencial agente en otros modelos tumorales, realizar imágenes en un equipo para animales pequeños, así como la evaluación de otras estrategias de marcado.

## **VII. Bibliografía**

1. VOGELSTEIN AND KINZLER K. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine*, Vol. 10:789-799.
2. HANAHAN, D. AND WEINBERG, R. A. (2000). The Hallmarks of cancers. *Cell Press*, Vol. 100: 57-70.
3. MENDOZA M., KHANNA C. (2009). Revisiting the seed and soil in cancer metastasis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 41:1452-62.
4. [www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es](http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es).
5. AMERICAN CANCER SOCIETY, *Cancer Facts & Figures, 2007*, en <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/cancer-facts-figures-2007>.
6. HAWLEY A. T. AND PANDOLFI P. P. (2008). *Etiology of Cancer: Cancer Susceptibility Syndromes* en De Vita V. T., Hellman S., Rosenberg S.A., eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 7th ed., 157-168.
7. WHO, en <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>.
8. GREY N. ET AL. (2006). *Reducing the global cancer burden*. Hospital Management, en <http://www.inoncology.com/oncology-research-and-cancer-information/clinical-cancer-research-and-statistics.html>.
9. FERLAY J., ET AL. (2008). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. GLOBOCAN.
10. BARRIOS E., ET AL. IV Atlas de mortalidad por cáncer en el Uruguay 2004-2008.
11. FISHER B., ET AL. (2002). Twenty-five-year follow-up of a randomized trial comparing radical mastectomy, total mastectomy, and total mastectomy followed by irradiation. *N Engl J Med*, Vol. 347:567-75.
12. <http://www.cancer.org>
13. LATARJET, M; RUIZ LIARD, A. (2008). *Anatomía Humana*. 4ª ed., Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1665-1668.
14. JEFFREY S. ROSS, ET AL. (2009). The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. *The Oncologist*, Vol. 14:320-368.
15. CHRISTOS SOTIROU AND LAJOS PUSZTAI, (Feb 2009). Molecular origin of cancer: gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* Vol. 360:790.
16. ROMOND E. H., PEREZ E. A., BRYANT J. ET AL. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2+ breast cancer. *N Engl J Med.*, Vol. 353:1673-1684.

17. DENT R., TRUDEAU M., PRITCHARD K. I., HANNA W. M., KAHN H. K. ET AL. (2007). Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clinical Cancer Research*, 4429-4434.
18. PEROU, C. M. (2011). Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The Oncologist*. Vol. 16:61-70.
19. CAREY L. A., PEROU C. M., DRESSLER L. G., LIVASY C.A., GERADTS J., COWAN D., ET AL. (2004) Race and the poor prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *J Clin Oncol*.
20. LAAKSO MERVI ET AL. (2006). Basolumental carcinoma: A new biologically and Prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*, Vol. 12 (14): 4185-4191.
21. SORLIE T., PEROU C. M., TIBSHIRANI R., AAS T., GEISLER S., JOHNSEN H. ET AL. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 98:10869-10874.
22. SORLIE T., TIBSHIRANI R., PARKER J., HASTIE T. ET AL. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Biological Sciences - Medical Sciences PNAS*. Vol. 100: 8418-8423.
23. HARRIS M., WINSHIP I., SPRIGGS M. (2005). Controversies and ethical issues in cancer genetics clinics. *Lancet Oncol*, Vol. 6:301-10.
24. STRUEWING J. P., HARTGE P., WACHOLDER S., BAKER S. M., BERLIN M., MCADAMS M., TIMMERMAN M. M., BRODY L. C., TUCKER M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, Vol. 336(20):1401-1408.
25. DENG C. H., BRODIE S. (2000). Roles of BCRA1 and its interacting proteins, *Bioessays*, Vol. 22:728-32.
26. ANTONIOU A. C., PHAROAH P. D. P., MCMULLAN G., DAY N. E., STRATTON M. R., PETO J. ET AL. (2002). A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer*, Vol. 86:76-83.
27. NASS S.J., DICKSON R.B. (1997). Defining a role for c-myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res. Treat*, Vol. 44:1-22.
28. Hollstein M., ET AL. (1991). p53 Mutations in Human Cancers. *Science*, Vol. 253: 49-53.
29. YILING LUA, XIANJUN FANGA AND HONGWEI WANGA. (2001). The role of genetic abnormalities of PTEN and the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in breast

- and ovarian tumorigenesis, prognosis, and therapy. *Seminars in Oncology*, Vol. 28, Supplement 16, October 2001: 125-141.
30. CLAUS E. B., SCHILDKRAUT J. M., THOMPSON W. D., RISCH N. J.(1996) The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*; Vol. 77:2318-24.
  31. AMERICAN CANCER SOCIETY (2012). *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society.
  32. HANKINSON S. E., COLDITZ G. A., WILLETT W. C. (2004). Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Res*, Vol. 6:213-218.
  33. DOMÍNGUEZ M.A., MARCOS M., MEIRIÑO, R., VILLAFRANCA E., DUEÑAS M. T., ARIAS F., MARTÍNEZ E. (2001). Prognostic and predictive factors in early breast cáncer. *Supl. 1*: 99-110.
  34. SLAMON D. J., CLARK G. M., WONG S. G., LEWIN W. J., ULRICH A., MCGUIRE W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, Vol. 235:177-182.
  35. YARDEN Y. (2000). The EGFR family and its ligands in human cancer signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, Vol. 37 (Suppl4): S3-S8.
  36. BLUME-JENSEN P., HUNTER T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, Vol. 411:355-65.
  37. GUY P. M., PLATKO J. V., CANTLEY L. C., CERIONE R. A., AND CARRAWAY K. L. (1994). Biochemistry Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosinekinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, Vol. 91: 8132-8136.
  38. FERGUSON K.M., BERGER M.B., MENDROLA J.M., CHO H.-S., LEAHY D.J., LEMMON M.A. (2003). EGF Activates Its Receptor by Removing Interactions that Autoinhibit Ectodomain Dimerization. *Molecular Cell*, Vol. 11, 507-517.
  39. FOWLER K. J., WALKER F., ALEXANDER W., HIBBS M.L., NICE E.C., BOHMER R.M., MANN G.B., THUMWOOD C., MAGLITTO R., DANKS J.A. ET AL. (1995). A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92(5):1465-9.
  40. GASSMANN M., CASAGRANDA F., ORIOLI D., SIMON H., LAI C., KLEIN R., LEMKE G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*. Vol. 378(6555):390-4.

41. ERICKSON S. L., O'SHEA K. S., GHABOOSI N., LOVERRO L., FRANTZ G., BAUER M., LU L. H., MOORE M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice. *Genetech Inc.*, Vol. 124(24):4999-5011.
42. YARDEN Y., SLIWKOWSKI M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol Cell. Biol.*, Vol. 2(2):127-37.
43. SCHNEIDER, M. AND WOLF, E. (2009). The Epidermal Growth Factor Receptor Ligands at a Glance. *J. Cell. Physiol.*, Vol. 218: 460-466.
44. PINKAS-KRAMARSKI R., EILAM R., ALROY I., LEVKOWITZ G., LONAI P., YARDEN Y. (1997). Differential expression of NDF/neuregulin receptors ErbB-3 and ErbB-4 and involvement in inhibition of neuronal differentiation. *Oncogene*, Vol. 15(23):2803-15.
45. RIESE DAVID J., KOMURASAKI TOSHI, PLOWMAN GREGORY D., AND STERN DAVID F. (1998) Activation of ErbB4 by the Bifunctional Epidermal Growth Factor Family Hormone Epregrulin Is Regulated by ErbB2. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, No. 18:11288-11294.
46. GUY, P. M., PLATKO, J. V., CANTLEY, L. C., CERIONE, R. A. AND CARRAWAY, K. L. (19994). Insect cell-expressed p180ErbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 91:8132-8136.
47. PINKAS-KRAMARSKI, R. ET AL. (1996) Diversification of Neudifferentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* Vol. 15:2452-2467.
48. RIESE, D. J. 2ND, VAN RAAIJ T. M., PLOWMAN, G. D., ANDREWS, G. C. AND STERN, D. F. (1995). The cellular response to neuregulins is governed by complex interactions of the ErbB receptor amily. *Mol. Cell. Biol.* Vol. 15:5770-5776.
49. AZAHAR, E; WATERMAN, H; CHEN, X ET AL. (1996). A Hierarchical Network of Interreceptor Interactions Determines Signal Transduction by Neu Differentiation Factor/Neuregulin and Epidermal Growth Factor. *Molecular and Cellular Biology.* Vol. 16:5276–5287.
50. WORTHYLAKE R., OPRESKO L. K., WILEY H.S. (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem*, Vol. 274:8865-8874.

51. TATEISHI M, ISHIDA T, KOHDONO S. ET AL. (1994). Prognostic influence of the co-expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surg Oncol*, Vol. 3:109-113.
52. EKSTRAND A. J., LONGO N., HAMID M. L., OLSON J. J., LIU L., COLLINS V. P., JAMES C. D. (1994). Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification. *Oncogene*, Vol. 9(8):2313-20.
53. SCAGLIOTTI GIORGIO V., SELVAGGI GIOVANNI, NOVELLO SILVIA AND HIRSCH FRED R. (2004). The Biology of Epidermal Growth Factor Receptor in Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, Vol.10: 4227 y ss.
54. FERNÁNDEZ MOLINA JUAN CARLOS Y PÉREZ PÉREZ VÍCTOR (2006). El receptor de EGF (EGFR): Una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y sus inhibidores. *Biocáncer* Vol. 3.
55. WOSIKOWSKI K, SCHUURHUIS D, KOPS G. J. ET AL. (1997). Altered gene expression in drug-resistant human breast cancer cells. *Clin. Cancer Res*, Vol. 3:2405-2414.
56. SIBILIA M, WAGNER E. F. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*, Vol. 269:234-8.
57. ZHANG H., BEREZOV A., WANG Q., ET AL. (2007). ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*, Vol. 117:2051-8.
58. STANTON P., RICHARDS S., REEVES J., NIKOLIC M., EDINGTON K., CLARK L., ROBERTSON G., SOUTER D., MITCHELL R., HENDLER F. J. (1994). Epidermal growth factor receptor expression by human squamous cell carcinomas of the head and neck, cell lines and xenografts. *Br J Cancer*, Vol. 70(3): 427-433.
59. REVILLION F., BONNETERRE J., PEYRAT J. P. (1998). ErbB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer*, Vol. 34:791-808.
60. ROJAS W., CANO L.E. (2001). *Inmunología*. 12a. ed. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas, pp.155-6.
61. OLE HENRIK BREKKE AND INGER SANDLIE (January, 2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature* Vol. 2: 52-62.
62. WINTER, G. AND W.J. HARRIS (1993). Humanized antibodies. *Immunol. Today*, Vol. 14:243-6.
63. KOHLER, G. AND MILSTEIN C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. *Nature*, Vol. 256:495-7.

64. MATEO C., MORENO E., AMOUR K., LOMBARDEO J., HARRIS W., PEREZ R. (1997) Humanization of a mouse monoclonal antibody that blocks the epidermal growth factor receptor: recovery of antagonistic activity. *Immunotechnology*, Vol. 3(1):71-81.
65. MORALES MORALES ALEJO A., DUCONGE JORGE, ALVAREZ-RUIZ DANIEL, ET AL. (2000). Humanized versus Murine Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies for Immunoscintigraphic Studies. *Next Nuclear Medicine and Biology*, Vol. 27, Issue 2, Pages 199-206.
66. CROMBET T., OSORIO M., CRUZ T., ET AL. (2004). Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol*, Vol. 22:1646-54.
67. VALLIS K.A., REILLY R.M., CHEN P., OZA A., HENDLER A., CAMERON R., HERSHKOP M., IZNAGA-ESCOBAR N., RAMOS-SUZARTE M., KEANE P. (2002). A phase I study of <sup>99m</sup>Tc-hR3 (DiaCIM), a humanized immunoconjugate directed towards the epidermal growth factor receptor. *Nucl Med Commun*, Vol. 23(12):1155-64.
68. CROMBET T, ET AL. (2004). Use of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody h-R3 in combination with radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer patients. *J Clin Oncol.*, Vol. 22(9):1646-54.
69. WEISSLEDER R. AND MAHMOOD U. (Mayo, 2001). La imagenología molecular. *Radiology*, Vol. 219 (2): 316-33. PMID 11323453.
70. MANKOFF D. A. (June, 2007). A definition of molecular imaging. *J Nucl Med.*; Vol. 48(6):18-21.
71. WARBURG O. (1956). Origin of cancer cells. *Science*, Vol. 123(3191):309-314.
72. MEARES C. F. AND GOODWIN D. A. (1984). Linking radiometals to proteins with bifunctional chelating-agents. *Journal of Protein Chemistry*, Vol. 3(2):215-228.
73. KURDZIEL K. A., RAVIZZINI G., CROFT B. Y., TATUM J. L., CHOYKE P. L., AND KOBAYASHI H. (2008). The evolving role of nuclear molecular imaging in cancer. *Expert Opin Med Diagn*, Vol. 2(7): 829-842.
74. KOWALSKY, R. J. AND FALEN, S. W. (2004). Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. *American Pharmacist Association DC*, pp. 256-277.

75. LIU, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced drugs delivery reviews*, Vol. 60: 1347-1370.
76. BANERJEE S., PILLAI M. R. A., AND RAMAMOORTHY N. (2001). Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.* Vol. 3:260–277.
77. LIU, S. (2003). The role of coordination chemistry in the development of target-specific radiopharmaceuticals. *Chem. Soc. Rev.* Vol. 27:43-55.
78. KURDZIEL K. A., RAVIZZINI G., CROFT B. Y., TATUM J. L., CHOYKE P. L., AND KOBAYASHI H. (2008). The evolving role of nuclear molecular imaging in cancer *Expert Opin Med Diagn*, Vol. 2(7): 829-842.
79. ALBERTO, R. (2005). New Organometallic Technetium Complexes for Radiopharmaceutical Imaging. *Top Curr Chem.*, Vol. 252:1-44.
80. DILWORTH J. R. AND PARROTTB, J. S. (1998). The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 27:43-55.
81. LIU S. AND SCOTT EDWARDS D. (1999). <sup>99m</sup>Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, Vol. 99:2235-2268.
82. CHILTON, H. M. (1990). *Pharmaceuticals in Medical Imaging*, Macmillan: New York, p. 305.
83. BANERJEE S., PILLAI R. M., RAMAMOORTHY N. (2001). Evolución de Tc-99m en radiofármacos de diagnóstico. *Semin Nucl Med.* Vol. 4:260-77.
84. ULRICH ABRAM AND ROGER ALBERTO (2006). Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications en Braz J. Chem. Soc., Vol. 17, No.8: 1486-1500.
85. HEPPELER A., FROIDEVAUX S., EBERLE A. N., MAECKE H. R. (2000). Receptor targeting for tumor localization and therapy with radiopeptides. *Curr. Med. Chem.*, Vol.7: 971-994.
86. BOERMAN O. C., OYEN W. J. G., CORSTENS F. H. M. (2000). Radiol-labeled receptor-binding peptides: a new class of radiopharmaceuticals, *Semin. Nucl. Med.* Vol. 30: 195-208.
87. ERIC D. AGDEPPA AND MARY E. SPILKER (June, 2009). A Review of Imaging Agent Development. *The AAPS Journal*, Vol. 11, No. 2.
88. WU A. M. AND SENTER PETER D. (2005). Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnology*, Vol. 23: 1137-1146.

89. TOVE OLAFSEN, PH.D.‡ AND WU ANNA M. (May, 2010). Novel Antibody Vectors for Imaging. *Semin Nucl Med.*, Vol. 40(3): 167-181.
90. ADAMS, G.P. ET AL. (2001). High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain Fv antibody molecules. *Cancer Res.* Vol. 61: 4750-4755.
91. ANDREW, S. M. AND TITUS, J. A. (1997) Fragmentation of immunoglobulin G, in *Current Protocols in Immunology* (Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W., eds.), Wiley. New York, pp. 2-10.
92. GARCÍA MERINO A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, Vol. 26:301-306.
93. HELMY K., ET AL. (2006). CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*, Vol. 124 (5):915-27.
94. BURVENICH I. J., ET AL. (2007). Biodistribution and planar gamma camera imaging of (123) I- and (131)I-labeled F(ab')<sub>2</sub> and F(ab) fragments of monoclonal antibody 14C5 in nude mice bearing an A549 lung tumor. *Nucl Med Biol*, Vol. 34:257-65.
95. WU, A. M. AND YAZAKI, P. J. (2000) Designer genes: recombinant antibody fragments for biological imaging. *Q. J. Nucl. Med.*, Vol. 44: 268-283.
96. KREITMAN ROBERT J. (January 24, 2006). Immunotoxins for Targeted Cancer THERapy. *The AAPS Journal*, Vol.8 (3), Article 63.
97. PAK K. Y., NEDELMAN M. A., FOGLER W. E., TAM S. H., WILSON E., VAN HAARLEM L. J. M., COLOGNOLA R. (1991). Evaluation of the 323/A3 Monoclonal Antibody and the Use of Technetium-99m-labeled 323/A3 Fab' for the Detection of Pan Adenocarcinoma. *Nucl. Med. Biol.*, Vol. 18, No. 5:483-497.
98. Preparation of Murine Monoclonal Antibody NR-LU-IO Fab for Technetium Tc-99m Imaging of Small Cell Lung Cancer (1994). *Clinical Rev.*, Vol. 37.
99. ERB D. A. AND NABI H. A. (2000). Clinical and technical considerations for imaging colorectal cancers with technetium 99m-labeled antiCEA Fab fragment. *J. Nucl. Med. Technol.* Vol. 28:12-18.
100. UTE KLINKHARDT, ET AL. (September, 2001). Pharmacodynamic characterization of the interaction between abciximab or tirofiban with unfractionated or a low molecular weight heparin in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.*, Vol. 52(3): 297-305.

101. WEIR N., ET AL. (2006). A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab' fragment anti-tumournecrosis factor- $\alpha$  monoclonal antibodies. *Therapy*, Vol. 3:535-45.
102. MELMED G. Y., TARGAN S. R., YASOTHAN U., HANICQ D., AND KIRKPATRICK P.(2008). Certolizumab pegol. *Nat. Rev. Drug Discov*, Vol. 7:641-642.
103. DELMON-MOINGEON L.I., MAHMOOD A., DAVISON A., JONES A.G. (1991). Strategies for labeling monoclonal antibodies and antibody-like molecules with technetium-99m. *J. Nucl. Biol. Med.*, Vol. 35:47-59.
104. HAKUR M. L. (1995). *Nuclear Medicine Communications*, Vol.16:724-732.
105. LIU S., EDWARDS D. S. (1999). *Chemical Reviews*, Vol. 99:2235-2268.
106. SPIES H., PIETZSCH J. (2007). Stannous Chloride in the Preparation of  $^{99m}\text{Tc}$  Pharmaceuticals. *Technetium-99m Pharmaceuticals*, pp 59-66.
107. LIU, S. (2008). Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced drugs delivery reviews*. Vol. 60:1347-1370.
108. ABRAMS M. J., ET AL. (1990). New Organometallic Technetium Complexes. *J. J. Nucl. Med.*, Vol. 31: 2022.
109. LEVENTE K. MESZAROS, ANICA DOSE, STEFANO C.G. BIAGINI, PHILIPS J. BLOWER. (2010). Hydrazinonicotinicacid (HYNIC)-Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. *Inorganica Chimica, Acta* 363: 1059-1069.
110. LIU S, EDWARDS D. S. (2001). *Drugs Future*, Vol. 26:375.
111. SWORIN M., RAJOPADHYE M., HARRIS T. D., EDWARDS D. S., CHEESMAN E., LIU S. (1996). PCT Int. App., WO 96/40637.
112. GARCÍA, M. F. (2012). Síntesis de ligandos heterocíclicos como agentes bifuncionales para la marcación con  $^{99m}\text{Tc}$  de péptidos para imagen molecular de la expresión del receptor de alfa-MSH. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.

## **VIII. Agradecimientos**

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis:

A mis tutores de tesis Msc. Victoria Calzada y al Dr. Omar Alonso por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo, por sus consejos, oportunidades y gran dedicación brindada. A Pablo Cabral por su aliento y por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo y a todos y cada uno de los compañeros del grupo y muy especialmente a Ximena Camacho, María Fernanda García Melián por sus aportes y a Marcelo Fernández por su ayuda y colaboración en el laboratorio y por su gran apoyo.

También quiero agradecer a mi familia y amigos por acompañarme durante esta etapa de mi vida.

Gracias a todos.

## **IX. Anexos**

# SÍNTESIS, MARCACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DOS POTENCIALES RADIOFÁRMACOS DE DIAGNÓSTICO DE TUMORES CON SOBREEXPRESIÓN DE HER1.

Calzada V<sup>1</sup>; Goicochea E<sup>1</sup>; García MF<sup>1</sup>; Camacho X<sup>1</sup>; Fernández M<sup>1</sup>; Porcal W<sup>2</sup>; Gambini JP<sup>2</sup>; Cabral P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Nucleares, UdelaR, Montevideo-Uruguay; <sup>2</sup>Grupo de Química Medicinal, Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas-UdelaR.

## INTRODUCCIÓN

El HER-1 es un receptor tirosina quinasa perteneciente a la familia de receptores EGFR. Se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama, entre otros, y es blanco para el desarrollo de nuevos agentes de diagnóstico y terapia.

El Nimotuzumab® es un anticuerpo monoclonal humanizado con gran afinidad por la porción extracelular del HER-1.

En este trabajo se realizó la marcación de Nimotuzumab-HYNIC y su fragmento Fab con <sup>99m</sup>Tc y su evaluación biológica en ratones CD-1 normales.

## MATERIALES Y METODOS

El anticuerpo entero Nimotuzumab fue purificado inicialmente por Sephadex G-25. Posteriormente una alícuota del mismo fue separada para realizar la digestión con papaína con el fin de obtener el fragmento Fab. El primer paso de purificación se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular, en columna Sephadex G-50. El segundo paso de purificación se realizó mediante columna de proteína A.

Una vez purificada la biomolécula (BM) el pH fue ajustado a 8.5 con NaHCO<sub>3</sub> 1M. Posteriormente se adicionó un exceso molar de HYNIC (5:1) disuelto en DMSO. La mezcla se incubó en oscuridad por 30 min a T<sub>ambiente</sub>. Para separar el HYNIC libre, la mezcla de reacción fue purificada por exclusión molecular, eluyendo con buffer acetato de sodio, 0.15 M pH 6.4.

Para verificar la identidad de la muestra obtenida se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10% junto con anticuerpo entero (~150.000 Da), usando como control suero albumina bovina (BSA~60.000 Da).

La identificación final del Fab fue realizada por espectrometría de masas en el equipo 4800 MALDI-TOF/TOF (ABi MDS Sciex).

Luego de la conjugación y purificación, las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C.

La marcación de los conjugados con <sup>99m</sup>Tc se realizó utilizando HYNIC-BM junto con SnCl<sub>2</sub> y Tricina (1:1:2). Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N<sub>2</sub> (g).

La marcación se realizó agregando <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>, hasta un máximo de 1 ml, una actividad de 37 MBq por miligramo de HYNIC-BM y se incubó por 30 min a temperatura ambiente.

La pureza radioquímica se controló por TLC y HPLC (ver Tabla).

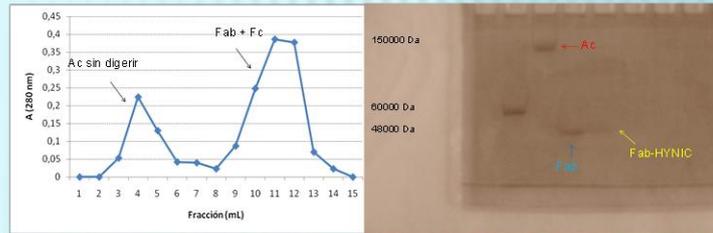
Control	Fase estacionaria	Fase móvil	Rf	Molécula
1	ITLC-SG	NaCl 0.9%	0.0	<sup>99m</sup> Tc-HYNIC-BM y <sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O
			1.0	<sup>99m</sup> Tc-tricina, <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
2	Watmann 1	MEK	0.0	<sup>99m</sup> Tc-HYNIC-BM, <sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O y <sup>99m</sup> Tc-tricina
			1.0	<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
3	ITLC-SG impregnada en BSA	EtOH-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O (2:1:5)	0.0	<sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O
			0.6-1	<sup>99m</sup> Tc-HYNIC-BM, <sup>99m</sup> Tc-tricina y <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>

Finalmente se comparó el comportamiento biológico de ambos mediante biodistribuciones en ratones CD-1 normales (1, 4 y 24 h) y en ratones CD-1 con adenocarcinoma mamario espontáneo (4 y 24 h).

## RESULTADOS

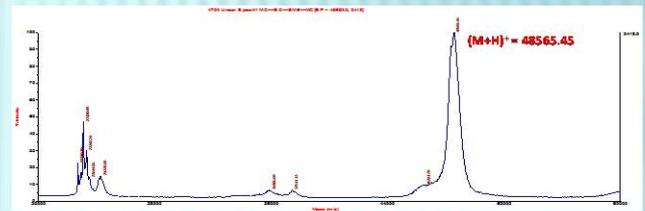
El rendimiento de la digestión del anticuerpo entero fue de 75 % y el Fab presentó un peso molecular de aproximadamente 48 kDa y un HYNIC por fragmento.

El rendimiento de las marcaciones para ambos agentes fue similar y mayor al 90% (PRQ).



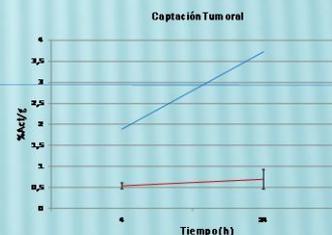
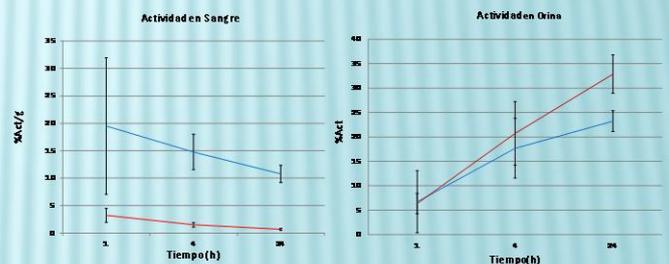
Purificación de Fab por Sephadex G-50

SDS-PAGE 10%



Maldi TOF/TOF del Fab-HYNIC

Los estudios biológicos mostraron una lenta depuración sanguínea para el anticuerpo entero  $10,77 \pm 1,56$  contrariamente al fragmento  $0,68 \pm 0,19$ , a las 24h (%Act/g). El anticuerpo entero mostró una alta metabolización hepática y el fragmento mostró una alta eliminación renal, observándose un  $32,89 \pm 3,91$  porcentaje de actividad en orina a las 24h



## CONCLUSION

Ambos agentes se marcaron eficientemente, comportándose diferente según sus características. Estos pueden ser potenciales agentes de diagnóstico de tumores HER-1+, con posibles aplicaciones en combinación a otros radionucléidos de terapia o emisores de positrones.

Agradecimientos: OIEA, ANII, PEDECIBA Química, CIMAB, UdelaR

# SÍNTESIS, MARCACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE DOS POTENCIALES RADIOFÁRMACOS DE DIAGNÓSTICO DE TUMORES CON SOBREEXPRESIÓN DE HER1.

Calzada V<sup>1</sup>; Goicochea E<sup>1</sup>; García MF<sup>1</sup>; Camacho X<sup>1</sup>; Fernández M<sup>1</sup>; Porcal W<sup>2</sup>; Gambini JP<sup>2</sup>; Cabral P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Nucleares, UdelaR, Montevideo-Uruguay; <sup>2</sup>Grupo de Química Medicinal, Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Montevideo, Uruguay. <sup>3</sup>Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas-UdelaR.

## INTRODUCCIÓN

El Her-1 es un receptor tirosina quinasa perteneciente a la familia de receptores EGFR. Se encuentra sobreexpresado en cáncer de mama, entre otros, y es blanco para el desarrollo de nuevos agentes de diagnóstico y terapia.

El Nimotuzumab® es un anticuerpo monoclonal humanizado con gran afinidad por la porción extracelular del Her-1.

En este trabajo se realizó la marcación de Nimotuzumab-HYNIC y su fragmento Fab con <sup>99m</sup>Tc y su evaluación biológica en ratones CD-1 normales.

## MATERIALES Y METODOS

El anticuerpo entero Nimotuzumab fue purificado inicialmente por Sephadex G25. Posteriormente una alícuota del mismo fue separada para realizar la digestión con papaína con el fin de obtener el fragmento Fab. El primer paso de purificación se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular, en columna sephadex-G50. El segundo paso de purificación se realizó mediante columna de proteína A.

Una vez purificada la biomolécula (BM) el pH fue ajustado a 8,5 con NaHCO<sub>3</sub> 1M. Posteriormente se adicionó un exceso molar de HYNIC (5:1) disuelto en DMSO. La mezcla se incubó en la oscuridad por 30 minutos a T<sub>ambiente</sub>. Para separar el HYNIC que no reaccionó, la mezcla de reacción fue purificada por exclusión molecular, eluyendo con buffer acetato de sodio, 0.15 M pH 6.4. Se recolectaron fracciones de 0.5 mL y se midió la absorbancia de diluciones 1/20 para determinar la concentración de la muestra. (λ=280, ε=1.4).

Para verificar la identidad de la muestra obtenida se realizó una electroforesis SDS-PAGE al 10%, usando como referencia la sero albumina bovina (BSA~60.000 Da) y el anticuerpo entero (~150.000 Da). La identificación final de la muestra fue realizada por Espectrometría de masas en el equipo 4800 MALDI-TOF/TOF (ABi MDS Sciex).

Luego de la conjugación y purificación, las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C.

La marcación de los conjugados con <sup>99m</sup>Tc se realizó 1mg de HYNIC-BM junto con SnCl<sub>2</sub> y Tricina (1:1:2). Todos los solventes empleados fueron previamente purgados con N<sub>2</sub> (g).

La marcación se realizó agregando <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>, hasta un máximo de 1 ml, una actividad de 37MBq por miligramo de BM y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

La pureza radioquímica se controló por ITLC y HPLC (ver Tabla).

Control	Fase estacionaria	Fase móvil	Rf	Molécula
1	ITLC-SG	NaCl 0.9%	0.0	<sup>99m</sup> Tc-HYNIC-BM y <sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O
			1.0	<sup>99m</sup> Tc-tricina, <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
2	Wátmarm 1	MEK	0.0	<sup>99m</sup> Tc-HYNIC-BM, <sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O y <sup>99m</sup> Tc-tricina
			1.0	<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
3	ITLC-SG impregnada en BSA	EtOH-NH <sub>3</sub> -H <sub>2</sub> O (2:1:5)	0.0	<sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O
			0.6-1	<sup>99m</sup> Tc-HYNIC-BM, <sup>99m</sup> Tc-tricina y <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>

Finalmente se comparó el comportamiento biológico de ambos mediante biodistribuciones en ratones CD1 normales (1, 4 y 24 h) y en ratones con adenocarcinoma mamario espontáneo (4 y 24 h).

## CONCLUSION

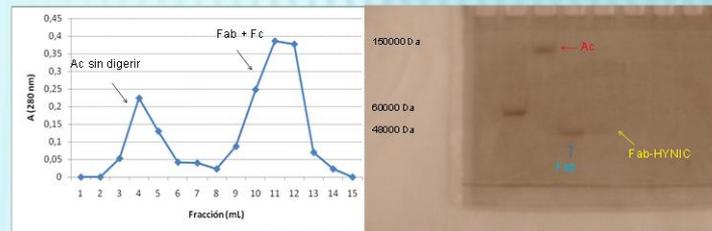
Ambos agentes se marcaron eficientemente, comportándose diferente según sus características. Estos pueden ser potenciales agentes de diagnóstico de tumores Her1+, con posibles aplicaciones en combinación a otros radionucléidos de terapia o emisores de positrones.

Agradecimientos: OIEA, ANII, PEDECIBA Química, CIMAB, UdelaR

## RESULTADOS

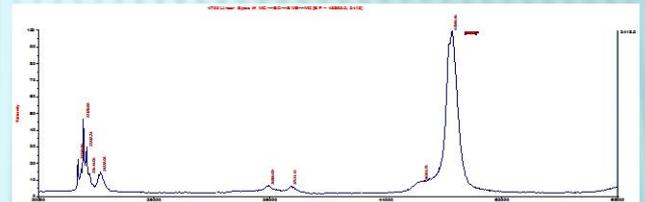
El rendimiento de la digestión del anticuerpo entero fue de 75 % y el Fab presentó un peso molecular de aproximadamente 48000Da y un HYNIC por fragmento.

El rendimiento de las marcaciones para ambos agentes fue similar.



Purificación de Fab por sephadex G50

SDS-PAGE 10%



Maldi TOF/TOF del Fab-HYNIC

Los estudios biológicos mostraron una lenta depuración sanguínea para el anticuerpo entero 10,77 ± 1,56 contrariamente al fragmento 0,68 ± 0,19, a las 24h. El anticuerpo entero mostró una alta metabolización hepática y el fragmento mostró una alta eliminación renal, observándose un 32,89 ± 3,91 de actividad en orina a las 24h.

