

^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab): potencial agente de imagen para diagnóstico de Linfoma No Hodgkin

Br. Carolina Perroni^a, MSc. Ximena Camacho^a,
MSc. en Química María Fernanda García^a, Br. Marcelo Fernández^a,
Dr Hugo Cerecetto^a, Dr. Juan Pablo Gambini^b, Dra. Eloisa Riva^c, Dr. Pablo Cabral^a

(a) Departamento de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(b) Centro de Medicina Nuclear, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

(c) Cátedra de Hematología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

RESUMEN

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es un factor clave en la angiogénesis tumoral de muchos tipos de tumores, incluyendo el Linfoma No Hodgkin (LNH). El objetivo del presente trabajo es la radiomarcación de los fragmentos de unión al antígeno (Fab) del anticuerpo monoclonal Bevacizumab con ^{99m}Tc y su evaluación como potencial agente de imagen para LNH. Para lograrlo se analizó la expresión de VEGF mediante citometría de flujo en una línea celular de LNH (Toledo). La fragmentación se realizó empleando papaína y los Fab obtenidos fueron conjugados con NHS-HYNIC-Tfa y radiomarcados con ^{99m}Tc. La pureza radioquímica y la estabilidad fueron ensayadas. Se realizaron estudios de biodistribución tanto en ratones sanos como en portadores de LNH. Se observó que las células Toledo presentaron una elevada expresión de VEGF. El radiomarcaje se realizó de forma rápida, sencilla, reproducible y estable, con purezas radioquímicas >90%. Los estudios de biodistribución revelaron una significativa captación renal y tumoral, indicando que la principal vía de eliminación es renal. De los resultados obtenidos se concluye que el ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) representa un potencial agente de imagen de la expresión de VEGF asociada a LNH.

PALABRAS CLAVE: Linfoma No Hodgkin, VEGF, Fab (Bevacizumab), ^{99m}Tc, HYNIC, Angiogénesis Tumoral.

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key factor in tumor angiogenesis in numerous types of tumors, including Non-Hodgkin Lymphoma (LNH). The objective of this paper is the radiolabeling of antigen-binding fragments (Fab) of the Bevacizumab monoclonal

antibody with ^{99m}Tc and its assessment as a potential imaging agent for LNH. In order to achieve this, it was analyzed the VEGF expression with flow cytometry in an LNH (Toledo) cell line. Fragmentation was carried out with papain and Fab obtained were conjugated with NHS-HYNIC-Tfa and labeled with ^{99m}Tc. Radiochemical purity and stability were tested. Biodistribution studies were performed in healthy mice and in LNH carriers as well. It was observed that Toledo cells showed a high VEGF expression. Radiolabeling was completed in a quick, easy, duplicable and stable manner, with radiochemical purities >90%. Biodistribution studies revealed a significant kidney and tumor accumulation, showing that the kidney clearance route is the most important one. From the obtained results, it is concluded that the ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) represents a potential imaging agent for VEGF expression associated to LNH.

KEY WORDS: Lymphoma, Non-Hodgkin, VEGF, Fab (Bevacizumab), ^{99m}Tc, HYNIC, Tumor Angiogenesis

1. INTRODUCCIÓN

El linfoma no Hodgkin (LNH) es la neoplasia hematológica más frecuente y quinta causa de muerte por cáncer en el mundo, más del 90% tiene origen en linfocitos B (1). Se sabe qué proceso de la angiogénesis es fundamental para el desarrollo tumoral y se encuentra regulado por la expresión de factores pro-angiogénicos, en especial por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (2). Esta sustancia es una glicoproteína producida tanto por las células normales como las neoplásicas, jugando un rol muy importante en situaciones fisiológicas como patológicas (3).

Recibido: Agosto 2017

Aceptado: Octubre 2017

Correspondencia: : Laboratorio de Radiofarmacia, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Mataojo 2055, P.O. 11400, Montevideo, Uruguay. Tel.: (+5982) 5250901/108; Fax: (+5982) 5250895

E-mail de contacto: pcabral@cin.edu.uy

Existen cada vez más evidencias que la angiogénesis tumoral juega un rol muy importante en las neoplasias hematológicas; relacionado a este proceso con eventos adversos y comportamientos clínicos muy agresivos en linfoma maligno. Sin embargo, el rol de la angiogénesis podría variar según los distintos subtipos de linfoma, debido a los valores de densidad microvascular y de la expresión de moléculas relacionadas con la angiogénesis, los cuales difieren entre los distintos subtipos de linfomas (4). En el caso de LNH, se ha observado una densidad microvascular incrementada que se encuentra fuertemente asociada, con las variantes más malignas de esta enfermedad (4,5). El grupo de Wang y col. fueron los primeros que examinaron el proceso de la angiogénesis en LNH, mediante técnicas in-vivo e in-vitro (6), revelando que las células de linfoma humanas además de secretar VEGF expresan sus receptores (VEGFR-1 como -2); apoyando una ruta autócrina para VEGFR-1 y parácrina para VEGFR-2 en el proceso de la linfomagénesis. Por lo tanto, es evidente la necesidad de estudios que promuevan el desarrollo de nuevas opciones de tratamiento y que sean eficaces en la lucha contra esta enfermedad.

Sobre la base de su papel clave en la angiogénesis tumoral, el eje VEGF/VEGFR ha llamado la atención en la búsqueda de nuevas dianas tumorales, lo que se explica por la gran variedad de agentes que están en desarrollo y cuyo blanco es la señalización mediada por VEGF. Por esta razón, es muy interesante utilizar blancos contra el VEGF humano que puedan ser manipulados como herramientas de imagen en estudios preclínicos, conformando así como posibles blancos para el mapeo del estímulo angiogénico en el microambiente tumoral. Una estrategia que se ha considerado en oncología, es el uso de proteínas marcadas radiactivamente con el fin de lograr monitorear las terapias antitumorales así como de lograr comprender la progresión e invasión tumoral (7). Todas las isoformas del VEGF han sido y son blancos muy atractivos de imagen, dado que proporcionan información, de una forma no invasiva, del estado del VEGF local, y por lo cual podrían ser útiles para guiar las terapias antiangiogénicas. Recientemente, la visualización tumoral y la observación de los niveles de VEGF in-vivo tumoral han sido posibles mediante el uso de la imagenología

molecular utilizando el VEGF (8-17).

Por lo anterior, se sabe que el VEGF es un factor parácrino derivado de los tumores, donde su expresión es necesaria para la entrega de oxígeno y nutrientes para el crecimiento tumoral, donde su bloqueo ha sido clave para el desarrollo de las denominadas estrategias antiangiogénicas. Unos de estos compuestos inhibidores del VEGF desarrollados es el anticuerpo Bevacizumab, anticuerpo monoclonal (AcMo) recombinante humanizado contra el VEGF-A165 (rhu Mab VEGF) (18,19).

La gran disponibilidad en centros de Medicina Nuclear convencionales, su química bien establecida con adecuadas propiedades nucleares [$t_{1/2} = 6,04$ h, $E_{\gamma} = 140$ KeV (89%)], hacen del tecnecio-99m un radionucleído indicado para la síntesis de este tipo agentes de imagen, aunado a su bajo costo (20,21). La química del marcado ya sea de péptidos como de proteínas con ^{99m}Tc de forma directa o a través de agentes quelantes bifuncionales (BFC) está bien establecida (21).

El empleo de AcMo radiomarcados dirigidos a antígenos asociados al tumor con el fin de visualizar, caracterizar y/o tratar el tumor, ha sido un área de intenso estudio (22). Tanto en radioinmunoterapia como en imagenología molecular, se requiere para su máxima efectividad una elevada acumulación del AcMo radiomarcado a nivel tumoral. Sin embargo presentan ciertas limitaciones como lenta depuración sanguínea y de tejidos no blanco asociadas a una alta captación hepática mediada por la interacción de los receptores Fc sobre los hepatocitos (disminuyendo la sensibilidad para imágenes de metástasis hepáticas que es un sitio común de diseminación tumoral). Es por ello que los fragmentos de unión al antígeno (Fab) de los AcMo representan adecuados candidatos como agentes de imagen, debido a que presentan una rápida depuración sanguínea y de tejidos no blanco, asociados a que no son secuestrados por el hígado (23).

El objetivo del presente trabajo es la radiomarcación de los fragmentos de unión al antígeno (Fab) del Bevacizumab con ^{99m}Tc vía el agente quelante bifuncional HYNIC y su evaluación radioquímica y biológica como un potencial agente de imagen preclínico para LNH.

2. METODOLOGÍA

2.1. Fragmentación del AcMo Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®) 25 mg/mL producido por Genetech, Inc., fue proporcionado por Laboratorios Roche.

La obtención de fragmentos Fab del Bevacizumab se realizó en dos 2 etapas. En la primer etapa se realizó la digestión de 5 mg del AcMo Bevacizumab empleando 0.5 mg de la enzima papaína (Sigma-Aldrich, relación 1:10) ambas disueltas en buffer de digestión (10 mM EDTA, 80 mM L-Cisteína-HCl, pH 7). Dicha enzima proteolítica provoca la ruptura de múltiples enlaces, en este caso es empleada para escindir el AcMo por la región bisagra para producir los fragmentos Fc y Fab del este. La mezcla de reacción fue incubada a 37 °C, a 225 rpm por durante 24 h. Pasado el respectivo tiempo, la mezcla de reacción fue centrifugada a 10000 rpm durante 10 min empleando un Amicon Ultra 0.5 mL centrifugal filters de 30 KDa. El concentrado obtenido se disuelve en buffer fosfato salino (PBS, pH 7) y posteriormente se mide su Absorbancia a 280 nm, para determinar la concentración de proteína obtenida utilizando un coeficiente de extinción molar de 1.45; con la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = \text{Abs}_{280} \cdot \text{Factor de dilución} / E_{280}$$

En la segunda etapa se realiza la purificación de los Fab mediante el empleo de una columna de Proteína A Agarosa (Thermo Fisher) equilibrada con PBS pH 7. Los fragmentos Fab obtenidos son recolectados y se determina su Absorbancia a 280 nm.

Como control del proceso de fragmentación se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 10 % en condiciones reductoras y no reductoras). Como controles de calidad de los fragmentos obtenidos se realizaron análisis por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF, Abi Sciex) de adquisición lineal y HPLC (Agilent 1200, Agilent Technologies, Italia) utilizando una columna TSK-GEL 63000 SWXL 7.8 mm x 30 cm (TOSHAAS), modo isocrático, buffer fosfato 0,05 M, pH 7.4, flujo 1 mL/min, equipado con detectores UV y NaI(Tl).

2.2 Derivatización, marcación y controles de calidad de HYNIC-Fab(Bevacizumab) con ^{99m}Tc

La reacción de conjugación se inició por adición de 33 µL

de NaHCO₃ 1M a 0.067 µmol de Fab(Bevacizumab) purificados. Luego se añadió 0.33 µmol de Suc-HYNIC en 7.1 µL DMSO (J. T. Baker). La mezcla se incubó a 18–25 °C por 30 min en oscuridad, pH 8. El conjugado se purificó, para separar el HYNIC libre, por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Sephadex G-25 (SEC) (PD-10, Amersham Biosciences). Se realizó MALDI-TOF/TOF para determinar la relación de conjugación de HYNIC con los Fab(Bevacizumab).

Para lograr optimas condiciones de marcado, se disolvió 44.6 µmol de tricina (N-[Tris(hidroximetil)-metil]glicina, Sigma) en 0.8 mL de agua, se ajustó el pH a 4.5 - 5 con 0,05 mL de HCl 2.0 M (solución A). En un segundo vial se disolvió 44.3 µmols de SnCl₂.2H₂O (J. T. Baker) en 0.5 mL HCl 2.0 M y 0.05 mL de esta solución se adicionó al vial de tricina. Finalmente se ajustó el volumen a 10 mL con solución NaCl 0,9 % (solución B). 10 µL de la solución B se adicionaron a 0.067 µmol de HYNIC-Fab(Bevacizumab), e inmediatamente se agregó Na^{99m}TcO₄ (Generador TecnoNuclear ^{99m}Mo-^{99m}Tc), no más de 1 mL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 30 min.

La pureza radioquímica (PRQ) fue evaluada utilizando cromatografía de exclusión molecular (SEC). Además se utilizaron distintos sistemas cromatográficos ITLC-SG (Pall Corporation) y NaCl 0,9 % ([Rf=0, ^{99m}TcO₂.H₂O y ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab)], [Rf=1, ^{99m}Tc-tricina y ^{99m}TcO₄-]); ITLC-SG embebida en albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) y EtOH:NH₃:H₂O (2:1:5) ([Rf=0, ^{99m}TcO₂.H₂O], [Rf=1 ^{99m}Tc-tricina, ^{99m}TcO₄- y ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab)]), y papel Whatman N°1 (Whatman International Ltd) y MEK ([Rf=0, ^{99m}TcO₂.H₂O, ^{99m}Tc-tricina y ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab)], [Rf=1, ^{99m}TcO₄-]) como fases estacionarias y móviles respectivamente. Los niveles de actividad se midieron luego de la incubación en un contador de centelleo sólido Capintec CRC7 con detector de cristal "3x3" de NaI(Tl) asociado a un analizador multicanal ORTEC. También se evaluó la PQR por HPLC.

2.3 Estabilidad de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab)

La integridad de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue analizado por medio de la incubación en 0.9% NaCl y suero a 37°C. Las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC hasta 4 h.

2.4. Ensayo de competencia con L-Cisteína

La estabilidad radioquímica del ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue analizado mediante un ensayo de competencia, descrito por Hnатовich et al (24). El ensayo se realizó mediante la incubación de 90 µL (3.7 MBq) de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) con 10 µL de L-Cisteína 1 y 10 mM (Sigma-Aldrich, USA), cuyas concentraciones finales en la solución resultaron de 0.1 y 1 mM de L-Cisteína, respectivamente. Todas las mezclas de reacción fueron incubadas a 37 °C y analizadas por HPLC hasta 4h.

2.5. Crecimiento de la línea celular Toledo

La línea celular humana Toledo originada a partir de Linfoma difuso de células grandes (DLCL, subtipo de LNH). La misma fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC). El medio base que se utilizó para esta línea celular fue RPMI-1640 (ATCC), para hacer que el medio de crecimiento sea completo se le agregó al medio Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado a una concentración final de 10 % y 2 mM de L-glutamina. El cultivo fue incubado a 37 °C con 5 % de Co₂.

2.6. Citometría de flujo empleando Fab(Bevacizumab)-FITC.

La capacidad relativa de unión al VEGF de los fragmentos Fab del Bevacizumab conjugados a Fluorescein isothiocyanate (FITC, Sigma-Aldrich) fue evaluada en la línea celular Toledo.

Se emplearon como controles a las células Toledo sin teñir como también un control de isotipo Ig de IgG1 humana conjugado a FITC (FITC-Isotipo) en la misma concentración al fragmento marcado (2 ug). Dichos controles permitirán controlar la tinción de fondo para calcular las señales de fluorescencia relativas en comparación con la señal de FITC-Fab(Bevacizumab).

Para llevar a cabo el ensayo, se resuspendieron 2 x 10⁵ células Toledo en 100 uL de PBS-BSA 1% para cada estudio (solo células, control isotipo y conjugado marcado) por triplicado. Posteriormente se adicionaron a las células tanto el control de isotipo como del conjugado marcado, ambos disueltos en PBS-BSA 1% durante 1 h y en oscuridad. En paralelo, pero previa a la adición tanto del control de isotipo como del fragmento marcado, se realizó la permeabilización de las células Toledo mediante la adición de 100 ul de 0.5% Tween/PBS

durante 5 min. Por último las células de ambos ensayos (sin permeabilizar como permeabilizadas) fueron lavadas tres veces con PBS (5 min, 600×g) y los datos fueron adquiridos empleando el citómetro de flujo FACSCALIBUR® (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.7. Modelo animal

Se emplearon ratones machos Balb/c y hembras Balb/c Nude, de 8-10 semanas (20-24 g), los cuales fueron obtenidos del bioterio animal de la Universidad de la República Oriental del Uruguay y del bioterio central de la Facultad de Medicina-USP.

Para llevar a cabo la inducción tumoral en ratones Balb/c Nude, se inyectaron de forma subcutánea las células Toledo a una concentración 0.5x10⁷ (con una viabilidad de por lo menos 95%). Todos los procedimientos fueron realizados según los principios éticos del Colegio Brasileiro de experimentación animal y aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de San Pablo (protocolo aprobado número 279/12).

Los ratones fueron mantenidos con agua y comida ad libitum durante todo el tiempo de experimentación, en un ambiente de temperatura y humedad controlado. Todos los procedimientos que involucran animales fueron aprobados por el Comisión Honoraria de Experimentación Animal local.

2.8. Estudios de biodistribución con ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab)

La evaluación biológica in-vivo del ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue realizada mediante estudios de biodistribución en ratones machos Balb/c y hembras Balb/c Nude portadores de tumores LNH inducidos. Animales (n=5 por grupo) fueron inyectados por la vena de la cola con aproximadamente 7.4 MBq del ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab) y sacrificados por dislocación cervical luego de 2, 6 y 24 h. Los tejidos seleccionados (tumor, corazón, hígado, pulmones, tiroides, riñones, estómago, bazo, tracto gastrointestinal y vejiga) fueron extirpados, enjuagados de la sangre residual, pesados y sus radiactividad medida en un detector de NaI (TI) anteriormente mencionado. La sangre y orina fueron también colectados y medidos en el contador gamma. La actividad de los órganos o tejidos y tumoral fue expresada como porcentaje de actividad (% Act) y como porcentaje de actividad por gramo de tejido (%Act/g).

2.7. Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba no apareada t. Fue considerado significativo un valor de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Obtención de los fragmentos de unión al antígeno (Fab) del Bevacizumab.

Para comprobar la efectiva digestión se realizó un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras y no reductoras. En la Figura 1 se aprecia que en condiciones reductoras (carriles 1 a 3) la presencia de una única banda tanto para el anticuerpo entero Bevacizumab (carril 1, 150 kDa aprox.), como de los fragmentos Fab del Bevacizumab (carril 2, 50 kDa aprox.) y fragmentos Fab del anticuerpo monoclonal Tocilizumab empleado como control (carril 3, aprox 50 kDa). Por otro lado, en condiciones reductoras (carriles 7, 8 y 9), en el caso del Bevacizumab (carril 7) se lograron apreciar todas las bandas correspondientes a un anticuerpo reducido; sin embargo en el caso de Fab de Bevacizumab (carril 8) y Tocilizumab (carril 9) únicamente se apreciaron dos bandas correspondientes a los pesos moleculares de 50 v 25 kDa.

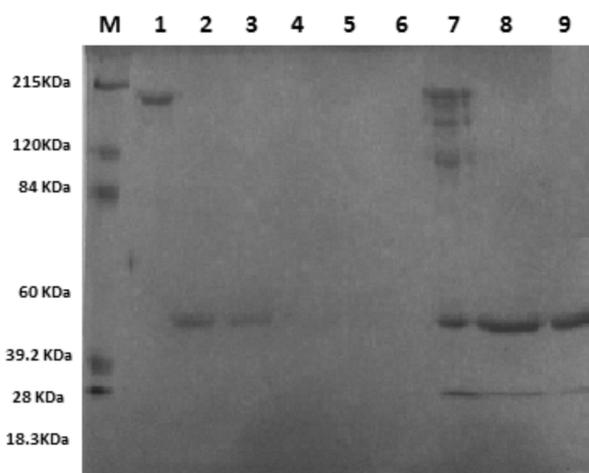


Figura 1. Análisis por SDS-PAGE al 10% en condiciones no reductoras y reductoras. M: Marcador de peso molecular; Carriles: 1) Bevacizumab, 2) Fab(Bevacizumab), 3) Fab(Tocilizumab), 7) Bevacizumab, 8) Fab(Bevacizumab), 9) Fab(Tocilizumab).

A su vez se analizó el proceso de digestión mediante MALDI-TOF y HPLC. Por MALDI-TOF se observó que la relación m/z del Fab(Bevacizumab) puro fue de 47072.5, (Figura 2).

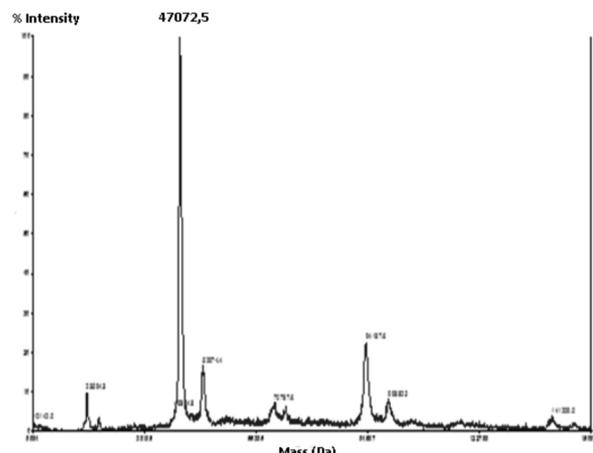


Figura 2. Espectro de masa de Fab(Bevacizumab).

Por HPLC, los Fab obtenidos presentaron un tiempo de retención (Rt) de 8.38 min (Figura 3).

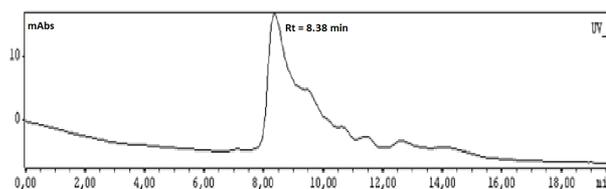


Figura 3. Análisis por HPLC de Fab(Bevacizumab).

3.2. Derivatización, marcación y controles de calidad HYNIC-Fab(Bevacizumab) con ^{99m}Tc

Suc-HYNIC fue conjugado a los Fab purificados obtenidos a temperatura ambiente por 30 min. Se empleó una columna PD10 para separar el HYNIC-Fab(Bevacizumab) conjugado del HYNIC libre. Más del 90% de la cantidad inicial de los fragmentos fueron recuperados según lo que se monitoreo por absorbancia UV a 280 nm usando un coeficiente de extinción molar de 1.4.

La relación m/z para el HYNIC-Fab(Bevacizumab) fue de 47173.5. Con las masas obtenidas por MALDI-TOF y usando como referencia la masa de HYNIC, se determinó que se une 1 molécula de HYNIC por molécula de Fab (Figura 4).

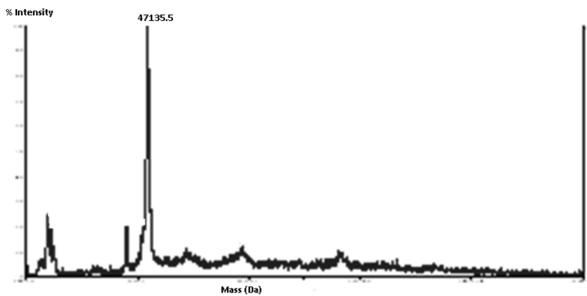


Figura 4. Espectro de masa de HYNIC- Fab(Bevacizumab).

Las condiciones óptimas de marcado de HYNIC-Fab(Bevacizumab) fueron determinados examinando diferentes concentraciones de tricina y $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en la reacción de marcado. La eficiencia de marcado de fragmentos obtenido fue de $96.8 \pm 2.4 \%$ con una relación de radio molar de tricina/ SnCl_2 9:10. El rendimiento de marcado fue confirmado por SEC y HPLC. El ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) se eluyó a 3 – 4 mL y el ^{99m}TcO₄- y ^{99m}Tc-Tricine libre a 7 – 8 mL en una columna PD-10 con solución salina.

La caracterización por HPLC para HYNIC-Fab(Bevacizumab) revelaron un Rt de 8.35 min mediante detección UV (Figura 5). A su vez se determinó el Rt para ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab), el cual fue de 8.35 min por detección UV y de 8.28 min por detección gamma (Figura 3A y 3B), no observándose otros picos adicionales en el espectro gamma que pudiesen corresponder a impurezas radioquímicas. A fin de conocer y lograr determinar las identidades de estas posibles impurezas radioquímicas se realizaron controles de ^{99m}TcO₄- y Tricina libre revelando Rts de 13,15 y 12,38 min, respectivamente.

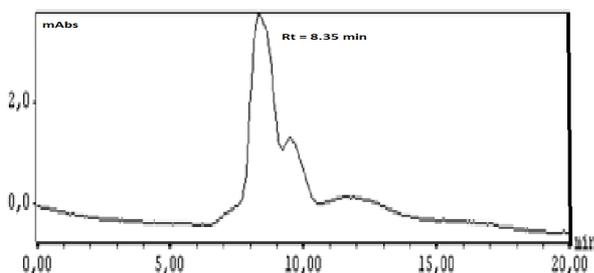


Figura 5. Espectro UV obtenido por HPLC para los Fab(Bevacizumab)-HYNIC sin marcar. Rt = 8.35 min.

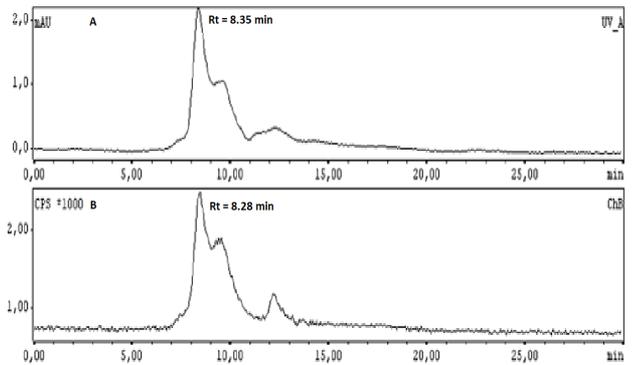


Figura 6. A) Espectro UV obtenido por HPLC de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab), Rt. 8.35 min. B) Espectro gamma obtenido por HPLC de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab), Rt = 8.28 min.

3.3. Estudios de estabilidad in-vitro

Los estudios de estabilidad radioquímica de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) revelaron que el marcado fue estable por al menos 4 h en NaCl 0.9% y a 37°C, mostrando una pequeña variación de la integridad del complejo de solo un 8 % a las 4 h mientras que en suero se observaron modificaciones de la estabilidad de aproximadamente un 5 % (Tabla 1).

Para evaluar la cinética de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) en condiciones fisiológicas, se llevó a cabo un estudio de competencia por medio de la incubación del conjugado marcado en distintas concentraciones de L-Cisteína. Se observaron inestabilidades del complejo marcado aproximadamente de 7 y 17 % luego de 4 h de incubación con 0.1 y 1 mM de L-Cisteína, respectivamente. Como control, todas las incubaciones se realizaron simultáneamente comparando con la incubación en NaCl 0.9% a 37°C (Tabla 1).

Los datos de la Tabla 1 indican que ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) se mantiene relativamente estable tanto en condiciones salinas como en suero, revelando señales de degradación únicamente al incubarse el complejo en cantidades importantes (gran exceso) del ligando competidor. Se sabe que la L-Cisteína es un ligando muy potente y que puede formar complejos muy estables con el ^{99m}Tc.

Tabla 1. Estabilidad radioquímica in vitro de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) en 0,9% NaCl, suero, 0.1 y 1 mM de L-Cisteína a 37°C. Las medidas de HPLC fueron obtenidas con una columna TSK-GEL 63000 SWXL 7.8 mm x 30 cm (TOSHAAS), modo isocrático, buffer fosfato 0,05 M, pH 7.4, flujo 1 mL/min., equipado con detectores de absorbancia UV y de centelleo NaI(Tl).

Tiempo (h)	%PRQ NaCl 0,9% a 37°C	%PRQ 1mM L-Cisteína a 37°C	%PRQ 0.1mM L-Cisteína a 37°C	%PRQ Suero a 37°C
0.5	99,50 ± 3,08	-	-	-
1	98,33 ± 2,34	93,52 ± 3,96	96,12 ± 3,32	98,58 ± 2,40
2	94,63 ± 3,44	92,39 ± 4,51	92,63 ± 5,68	97,21 ± 4,84
3	93,55 ± 3,22	92,12 ± 3,12	92,51 ± 3,14	94,85 ± 3,27
4	91,05 ± 5,19	82,81 ± 1,02	92,08 ± 1,56	94,17 ± 5,58

3.4. Análisis por Citometría de flujo en la línea celular Toledo con FITC-Fab(Bevacizumab)

En la Figura 7 se observan los histogramas respectivos de los análisis por citometría de flujo tanto de las células sin permeabilizar (Figura 7.A) como permeabilizadas con Tween (Figura 7.B) empleando FITC-Fab(Bevacizumab). Se logró observar el aumento de la capacidad de unión de FITC-Fab(Bevacizumab) al VEGF al ser permeabilizadas las células en comparación a las células sin permeabilizar; verificando de esta forma que dicha línea celular podría ser un adecuado modelo para la inducción de tumores de LNH; así como también para lograr analizar el proceso de la angiogénesis tumoral en LNH asociado a la sobreexpresión del VEGF.

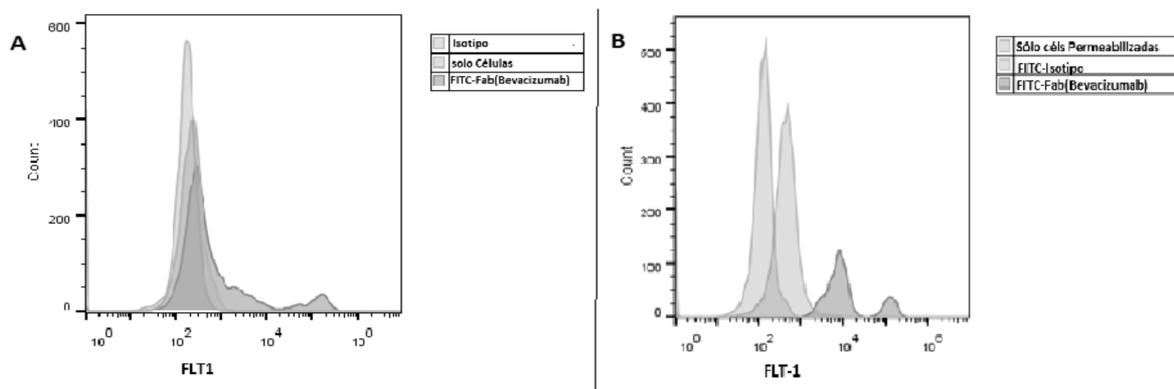


Figura 7. A) Análisis por citometría de flujo en la línea celular Toledo sin permabilizar y **B)** permeabilizadas con Tween empleando: control sólo células; control de isotipo y FITC-Fab(Bevacizumab).

3.5. Estudios de biodistribución en ratones Balb/c nude normales y portadores de LNH inducidos.

Los resultados de la caracterización farmacológica se muestran en la Tabla 2 ^{99m}Tc-HYNIC-Fab (Bevacizumab).

Fue observada una elevada retención de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) a nivel de los riñones, sugiriendo que este radiotrazador posee un metabolismo renal. La radioactividad en los riñones de ratones portadores de tumores fue de 6.06 ± 20.97 %Act/g, 6.90±19.36 %Act/g y 3.09 ± 5.79 %Act/g a 2, 6 y 24 h, respectivamente. En el hígado, la absorción a los mismos tiempo fue 4.21 ± 0.33 %Act/g, 3.24 ± 0.95 y 3.85 ± 1.38 %Act/g, respectivamente. Estos datos están acompañados por el bajo porcentaje de dosis inyectada en el intestino y alto

porcentaje de dosis inyectada a nivel de la orina. A 2 h p.i., 68.78 ± 2.60 %Act de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) ha sido excretada en la orina y 4.16 ± 1.90 %Act detectada en los intestinos, en ratones portadores de tumores (n=5). Los valores de la orina incluyen el %Act a partir de la orina colectada y también la obtenida en la vejiga.

Se observó a nivel tumoral una elevada retención de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab). A 2 h luego de la inyección, la absorción a nivel tumoral fue de 2.44 ± 0.72 %Act/g seguido por 1.43 ± 0.49 %Act/g a 6 h y 4.90 ± 1.30 %Act/g a 24 h luego de su inyección. Además se observaron relaciones tumor vs. músculo de 3.42, 5.13 y 7.88 a 2, 6 y 24 h, respectivamente.

Tabla 2. Estudios farmacocinéticos de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) utilizando ratones Balb/C normales y portadores de tumores LNH inducido a 2, 6 y 24 h p.i. Los valores fueron expresados como %Act por gramo (o %Act) (media ± SD, n=5).

Tejidos	Ratones Balb/C normales			Ratones Balb/C nude con tumor inducido		
	2 h	6 h	24 h	2 h	6 h	24 h
Porcentaje de dosis inyectada/gramo (%Act/g)*						
Sangre	0.69±0.09	0.74±0.20	0.80±0.46	7.01±0.63	3.26±1.10	1.77±0.64
Hígado	1.35±0.03	0.91±0.14	0.75±0.21	4.21±0.33	3.24±0.95	3.85±1.38
Corazón	1.04±0.10	1.01±0.14	0.61±1.01	2.69±0.86	1.27±0.29	1.51±0.53
Pulmones	1.84±0.06	1.41±0.52	1.76±0.63	3.16±1.16	1.88±0.56	2.37±1.63
Bazo	0.75±0.13	0.47±0.25	1.31±0.23	3.44±0.30	2.47±0.65	1.11±0.71
Riñones	4.48±0.08	3.92±0.63	2.72±0.50	6.06±20.97	6.90±19.36	3.09±5.79
Tiroides	1.47±0.43	0.56±0.12	1.39±0.79	2.04±1.24	1.22±0.35	2.25±0.86
Músculo	1.06±0.52	1.10±0.31	0.40±0.68	0.71±0.09	0.28±0.07	0.62±0.58
Hueso	1.79±0.96	2.11±0.44	1.14±0.47	1.59±0.33	0.83±0.30	0.97±0.06
Estómago	1.19±0.26	0.84±0.18	0.70±0.46	2.73±0.79	4.87±3.00	1.09±0.07
TI	1.72±0.27	1.91±0.51	1.56±0.40	2.33±0.69	3.49±1.40	0.74±1.00
Tumor	-	-	-	2.44±0.72	1.43±0.49	4.90±1.30
Porcentaje de dosis inyectada (%Act)*						
Intestino	2.76±0.72	2.72±0.40	2.45±0.63	4.16±1.90	3.60±1.53	2.84±1.99
Orina	88.73±0.63	87.27±0.48	90.60±2.22	68.78±2.60	76.60±8.20	82.28±1.56
Uptake ratio of tumor/normal tissue*						
Tumor/Sangre	-	-	-	0.35	0.44	2.77
Tumor/Músculo	-	-	-	3.42	5.13	7.88

* Datos presentados como %Act/g (o %Act) ± desviación estándar (DS) (n=5). TI=Tracto intestinal.

4. DISCUSIÓN

El Bevacizumab es un AcMo capaz de unirse a los factores VEGF; el cual es una de las principales moléculas involucradas en la angiogénesis tumoral. Se han encontrado que existen niveles elevados de VEGF en LNH y que corresponden a un mal pronóstico. Debido a que los fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales (fragmentos Fab) poseen adecuadas características para estudios diagnóstico es por ello que representan potenciales candidatos para imagenología. De esta forma la marcación de los fragmentos Fab con un emisor gamma, como el ^{99m}Tc , se podría emplear como método diagnóstico para evaluar tanto la localización de la lesión como su extensión, así como también para el seguimiento de pacientes con LNH.

El objetivo del presente trabajo fue la marcación de los fragmentos Fab del Bevacizumab con ^{99m}Tc mediante el agente bifuncional HYNIC con su posterior evaluación radioquímica y biológica a través de diferentes ensayos.

Es muy importante en la marcación de moléculas blanco con radionucleidos metálicos que retengan la actividad biológica de la biomolécula. El grupo 6-hidrazinonicotinil, conocido como HYNIC, es uno de los agente quelantes bifuncionales más utilizados (25). La amplia mayoría de los radiofármacos que están clínicamente disponibles en Medicina Nuclear son complejos de ^{99m}Tc debido a las favorables características fisicoquímicas de este radionucleido. Además, el ^{99m}Tc es fácilmente disponible y a bajos costos a partir de generadores de ^{99}Mo - ^{99m}Tc .

Para llevar a cabo los estudios, primariamente se procedió a realizar la fragmentación del AcMo Bevacizumab empleando la enzima papaína, con su posterior purificación mediante el empleo de una columna de proteína A. Se logró verificar mediante SDS al 10 % como por HPLC la presencia de los Fab obtenidos de forma pura, con un peso molecular aproximado de 50 kDa. Posteriormente se realizó la derivatización con HYNIC de los fragmentos Fab purificados y se controló la conjugación mediante espectrometría de masa y HPLC, confirmando la efectiva derivatización de los fragmentos y que nos permitió estimar el número de moléculas de BFC por Fab. Al evaluar los pesos moleculares, se

obtuvo una relación Fab (Bevacizumab):HYNIC de aproximadamente 1:1. Estos resultados significan una adecuada conjugación por parte del Fab al agente quelante bifuncional HYNIC, lo que posibilitaría obtener adecuadas actividades específicas.

Las marcaciones de los fragmentos conjugados con ^{99m}Tc se desarrollaron de forma rápida y sencilla, presentado altas purezas radioquímicas, según se pudo evaluar por distintos sistemas cromatográficos. Complementariamente los resultados obtenidos por HPLC muestran un marcado estable que no parece afectar la integridad del Fab y sin presencia de agregados proteicos.

La estabilidad in-vitro del radiomarcado evaluada mostraron altos niveles de pureza en todas las condiciones estudiadas. El estudio realizado con el agente de competencia L-Cisteína mostró una disminución de la estabilidad en un 17% a 4 h para concentraciones de 1mM, mientras que a 0,1 mM se observó un cambio de 7% de la PRQ. Estos resultados son esperados dado que la L-Cisteína es un agente de competencia que a concentraciones altas resulta un competidor muy potente por el radionucleido ^{99m}Tc formando complejos muy estables con el mismo.

Para comprobar la capacidad relativa de unión al VEGF de los fragmentos Fab del Bevacizumab se realizó un ensayo por citometría de flujo empleando una línea celular humana de LNH (Toledo). En dicho estudio se logró verificar la efectiva expresión y unión por parte de los fragmentos Fab del Bevacizumab al VEGF expresado por las células Toledo. Este ensayo nos verificó que la inducción tumoral con dicha línea celular podría ser un adecuado modelo para comprobar la expresión de VEGF asociado a LNH. Posteriormente, se realizaron estudios para determinar el perfil farmacocinética del Fab(Bevacizumab) radiomarcado mediante la realización de ensayos de biodistribución con ratones Balb/C normales y portadores de tumores LNH inducido a 2, 6 y 24 h. Se logró observar que posiblemente las pequeñas diferencias significativas de la absorción de ^{99m}Tc -HYNIC-Fab (Bevacizumab) entre los ratones normales y portadores de tumores inducidos en todos los órganos analizados, podría deberse a la inducción tumoral.

Sin embargo, tanto en los ratones normales como portadores de tumores, se observó una rápida depuración sanguínea, con eliminación renal principalmente, y ausencia de captación apreciable en otros órganos. La eliminación renal, se sabe que es debido a productos de metabolización de los Fab los cuales pueden ser filtrados por el glomérulo renal unidos a radionucleido. Los datos de la biodistribución de los ratones portadores de tumores inducidos mostraron que a nivel tumoral poseen una elevada retención de ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab). Dos horas luego de la inyección, la absorción a nivel tumoral fue de $2.44 \pm 0.72\%$ Act/g seguido por $1.43 \pm 0.49\%$ Act/g y $4.90 \pm 1.30\%$ Act/g a 6 y 24 h, respectivamente. Además se observaron adecuadas relaciones tumor vs músculo las cuáles nos permitirían pensar en la realización de imágenes a partir de 2 h posterior la inyección del compuesto marcado.

5. CONCLUSIONES

Fab(Bevacizumab) fue radiomarcado con ^{99m}Tc empleando HYNIC como AQB obteniéndose adecuadas estabilidad, PQR y especificidad in-vitro e in-vivo. ^{99m}Tc-HYNIC-Fab(Bevacizumab) representa un potencial agente de imagen de la expresión de VEGF asociada a LNH.

Agradecimientos

Los autores quisieran agradecer a Laboratorios Roche® por proporcionarnos el Bevacizumab (Avastin®). Este trabajo fue apoyado por el Espacio Interdisciplinario de la Universidad de la República (Uruguay) y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay). No existen conflictos de intereses.

6. REFERENCIAS

- (1) Swerdlow AJ. Epidemiology of Hodgkin's disease and nonHodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2003; 30 Suppl 1:S3-12.
- (2) Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999; 15(12):1359-64.
- (3) Rosen LS. VEGF-Targeted Therapy: Therapeutic Potential and Recent Advances. *The Oncologist* 2005; 10(6):382-91.

- (4) Koster A, Raemaekers JM. Angiogenesis in malignant lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2005; 17(6):611-6.
- (5) Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein H. Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castelman disease. *J Pathol* 1997; 183(1):44-50.
- (6) Vacca A, Ribatti D, Ruco L, Giacchetta F, Nico B, Quondamteo F, et al. Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer* 1999; 79(5-6):965-70.
- (7) Riley LB, Desai DC. The Molecular Basis of Cancer Development of Targeted Therapy. *Surg Clin N Am* 2009; 89(1):1-15.vii.
- (8) Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Oncol* 2006; 3(1):24-40.
- (9) Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H, et al. In vivo VEGF imaging with radiolabeled Bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med* 2007; 48(8):1313-1319.
- (10) Stollman TH, Scheer MG, Leenders WP, Verrijp KN, Soede AC, Oyen Wj, et al. Specific imaging of VEGF-A expression with radiolabelled anti-VEGF monoclonal antibody. *Int J Cancer* 2008; 122(10):2310-4.
- (11) Stollman TH, Scheer MG, Franssen GM, Verrijp KN, Oyen Wj, Ruers TJ, et al. Tumor accumulation of radiolabelled bevacizumab due to targeting of cell- and matrix-associated VEGF-A isoforms. *Cancer Biother Radiopharm* 2009; 24(2):195-200.
- (12) Chang SK, Rizvi I, Solban N, Hasan T. In vivo optical molecular imaging of vascular endothelial growth factor for monitoring cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2008; 14(13):4146-53.
- (13) Scheer MG, Stollman TH, Boerman OC, Verrijp KN, Sweep FC, Leenders PJ, et al. Imaging liver metastases of colorectal cancer patients with radiolabelled bevacizumab: lack of correlation with VEGF-A expression. *Eur J Cancer* 2008; 44(13):1835-40.

- (14) Camacho X, Calzada V, Fernández M, Alonso O, Chammas R, Riva E, et al. "177Lu-DOTA-Bevacizumab: Radioimmunotherapy Agent for Melanoma". *Curr Radiopharm* 2017; 10(1):21-8.
- (15) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Alonso O, Gambini JP, et al. "^{99m}Tc-labeled Bevacizumab vía HYNIC for Imaging of Melanoma". *J Anal Oncol* 2014; 3(1):53-64.
- (16) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Chabalgoity JA, Moreno M, et al. "[^{99m}Tc(CO₃)]-Radiolabeled Bevacizumab: In vitro and in vivo Evaluation in a Melanoma Model". *Oncology* 2013; 84(4):200-9.
- (17) Camacho X, García MF, Calzada V, Fernández M, Porcal W, Alonso O, et al. "Synthesis and Evaluation of ^{99m}Tc Chelate-conjugated Bevacizumab". *Curr Radiopharm* 2013; 6(1):12-9.
- (18) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Crtwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(23):2335-42.
- (19) Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57(20):4593-9.
- (20) Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev* 1993; 93(3):1137-56.
- (21) Dilworth JR.; Parrott JS. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. *Chem Soc Rev* 1998; 27(1):43-55.
- (22) Wu AM.; Olafsen T. Antibodies for molecular imaging in cancer. *Cancer J* 2008; 14(3):191-7.
- (23) Calzada V, García MF, Alonso-Martínez LM, Camacho X, Goicochea E, Fernández M, et al. "Fab (nimotuzumab)-HYNIC-^{99m}Tc: Antibody fragmentation for molecular imaging agents". *Anticancer Agents Med Chem* 2016; 16(9):1184-9.
- (24) Hantowich DJ, Virzi F, Fogarasi M, Rusckowski M, Winnard P Jr. Can a Cysteine Challenge Assay Predict the In vivo Behavior of ^{99m}Tc-labeled Antibodies? *Nuc Med Biol* 1994; 21(8):1035-1044.
- (25) Abrams MJ, Juweid M, tenKate CI, Schwartz DA, Hauser MM, Gaul FE, et al. Technetium-^{99m}-Human Polyclonal IgG Radiolabeled via the Hydrazino Nicotinamide Derivatives for Imaging Focal Sites of Infection in Rats. *J Nuc Med* 1990; 31(12):2022-2018.