



MX0300294

PERSPECTIVAS DIAGNÓSTICAS Y TERAPÉUTICAS EN MEDICINA NUCLEAR: BIOMOLÉCULAS RADIOMARCADAS

Guillermina Ferro Flores¹, Consuelo Arteaga de Murphy², Laura Meléndez Alafort³ y
Martha Pedraza López²

¹Gerencia de Aplicaciones Nucleares en la Salud. Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México

²Departamento de Medicina Nuclear. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

³Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de México

Resumen

Desde su inicio, la química de radiofármacos se ha dirigido al estudio de la química molecular. Los radiofármacos son únicos en su capacidad para detectar sitios bioquímicos específicos tales como los receptores y las enzimas. Con la reciente obtención de la secuencia estructural completa del genoma, no cabe duda de la importancia que han adquirido las imágenes moleculares para el estudio de la información genética a las alteraciones fenotípicas en la química del cuerpo humano. Así, el futuro de la medicina nuclear diagnóstica y terapéutica, se basa prácticamente en el estudio de fragmentos proteicos, estructuras peptídicas y cadenas de ADN radiomarcadas, para el estudio del metabolismo in vivo. Estas investigaciones representan un cambio sustancial en los paradigmas del desarrollo farmacéutico, al emplear las propias capacidades orgánicas como fuente de medicamentos, en lugar de considerar al organismo como un simple tubo de ensayo donde actúan moléculas extrañas, como son la mayoría de los medicamentos "tradicionales".

La investigación de nuevas técnicas para diseñar complejos estables de Tc-99m, Re-188, Lu-177, Y-90 y Dy-166/Ho-166 con biomoléculas, que no alteren la especificidad y en general las propiedades moleculares de las mismas, es un tema de interés mundial en el ámbito de la química de radiofármacos. En este trabajo se presentan algunos logros y perspectivas sobre los principales radiofármacos diagnósticos y terapéuticos de tercera generación.

Péptidos análogos de la somatostatina

Los péptidos son compuestos que contienen aminoácidos (ácidos α -aminocarboxílicos) unidos por enlaces peptídicos, es decir, por la unión del carboxilo terminal de un aminoácido y el amino terminal del siguiente. Diseñados por naturaleza para estimular, regular o inhibir numerosas funciones de la vida, actúan principalmente como transmisores de información y coordinadores de actividades de varios tejidos en el organismo.

La somatostatina es una hormona peptídica, se detectó por primera vez en el hipotálamo y controla la liberación de las hormonas hipofisarias. Está formada por 14 residuos de aminoácido en forma de anillo que se une por un puente disulfuro formado entre dos residuos de cisteína. Posteriormente, se ha encontrado en otras zonas donde

actúan como neurotransmisor y neuromodulador. Ejerce una acción inhibitoria sobre la liberación de la hormona del crecimiento a partir de la hipófisis anterior y sobre otros péptidos funcionalmente activos, insulina, tirotrópina, hormona paratiroidea y hormonas gastrointestinales.

Los receptores de la somatostatina se han identificado en varias células de origen neuroendócrino y estructuralmente están relacionados con las glicoproteínas de la membrana integral. Dado que la vida media biológica de la somatostatina es de segundos, se han preparado diversos péptidos análogos pequeños que conservan la cadena de amino ácidos específicos de la somatostatina, generalmente como octapéptidos cíclicos.

Octreotide	DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr(OL)
[Tyr ³]Octreotide	DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr(OL)
Vapreotide	DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Val-Cys-Trp-NH ₂
Lanreotide	DβNal-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Val-Cys-Thr-NH ₂
Octreotate	DPhe-Cys-Phe-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr
[Tyr ³]Octreotate	DPhe-Cys-Tyr-DTrp-Lys-Thr-Cys-Thr
Depreotide	(N-Me)Phe-Tyr DTrp-Lys-Val-Hcy(CH ₂ CO-β-Dap-Lys-Cys-Lys-NH ₂)

Cuadro 1: Secuencia de aminoácidos de péptidos análogos de la somatostatina.

Diversos tumores, tanto de origen neuroendócrino como no-neuroendócrino, contienen un alto número de receptores de somatostatina, por ello, la localización in vivo de tumores primarios y sus metástasis por centelleografía es posible mediante el empleo de análogos radiomarcados de la somatostatina como por ejemplo el octreotide. Asimismo, los granulomas y procesos autoinmunes pueden también ser visualizados debido a la acumulación local de leucocitos mononucleares con receptores de somatostatina activados.

El primer péptido radiomarcado de uso clínico para obtener imágenes de tumores fue el ¹¹¹In-DTPA-octreotide, con una adecuada afinidad por receptores de somatostatina de tipo SSTR2 y SSTR5 (K_i = 1.2 nM). A pesar de las pobres características del In-111 como un radionúclido para imágenes, el radiopéptido se utilizó exitosamente en la localización de tumores de origen neuroendócrino y cáncer pulmonar.

Con base en esta estructura, se han sintetizado otros péptidos análogos como los que se muestran en el Cuadro 1.

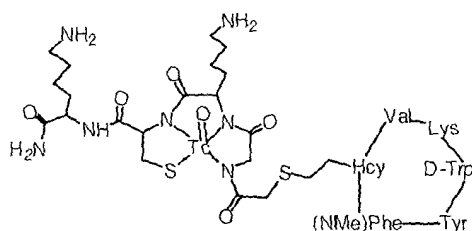


Figura 1. ^{99m}Tc -Depreotide

El ^{99m}Tc -Depreotide (Fig. 1) es útil en la detección de cáncer primario y metastático pulmonar, en linfoma Hodgkin y no Hodgkin y en cáncer de mama con una principal afinidad a receptores de somatostatina del tipo SSTR3 y ligera menor afinidad a SSTR2 y SSTR5 respecto al octreotide.

El [Tyr³]Octreotide (TOC) se sintetizó originalmente como un análogo del octreotide con un sitio habilitado para la radioyodación. Sin embargo, la sustitución del aminoácido Phe³ por Tyr³ produjo un incremento en la hidrofiliía del complejo así como una mayor internalización celular y captación tumoral (de Jong y cols., 1998), por lo que en lugar de su marcado con yodo se le han acoplado agentes biquelantes como DTPA, MAG₃, N₃S, HYNIC y DOTA para su marcado con Tc-99m, Y-90 e In-111 (de Jong, 1998; Decristoforo y Mather, 1999).

El lanreotide y vapreotide (RC-160) son otros análogos que, aunque útiles para receptores de somatostatina del tipo SSTR3 y SSTR4 respectivamente, han sido poco estudiados para su marcado con Tc-99m. No obstante ^{111}In -DOTA-lanreotide ha mostrado alta captación en líneas celulares tumorales de próstata, mama, colon, páncreas y adenocarcinomas. Asimismo, el lanreotide marcado con Re-188 (Meléndez y cols., 1999) se capta en tumores de cuello uterino implantado subcutáneamente en ratones atímicos (Murphy y cols., 2001a).

El [Tyr³]Octreotate (Y3-TATE) difiere del TOC en que el C-terminal del Trp contiene el ácido carboxílico tradicional en lugar del grupo alcohol. Esto le confiere una mayor capacidad de internalización a las células tumorales y una mayor depuración sanguínea (Bakker y cols., 2000). Su marcado con Lu-177 que permita su aplicación terapéutica se encuentra en desarrollo.

Inhibidores de la Angiogénesis

La angiogénesis, o la formación de nuevos vasos sanguíneos, es un proceso controlado por ciertos productos químicos producidos por el cuerpo. El producto químico que hace que este proceso se detenga se llama inhibidor de la angiogénesis.

El cáncer se disemina por medio de la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales suministran oxígeno y sustancias nutritivas a las células cancerosas, ayudando a que las células crezcan, invadan los tejidos cercanos y se diseminen a otras áreas del cuerpo (metástasis). Actualmente se estudian formas de detener la angiogénesis, con la esperanza de que los inhibidores de ésta eviten el crecimiento de las células

cancerosas impidiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos. En los estudios con animales, los inhibidores de la angiogénesis han evitado el crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos, provocando la disminución del cáncer y en algunos casos su completa desaparición.

Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas

Las integrinas son receptores que median la adhesión celular y regulan la formación de complejos de señalización. Se requieren modificaciones en la expresión de integrinas durante las siguientes etapas de la generación de metástasis:

- a) angiogénesis intratumoral;
- b) desprendimiento del tumor primario;
- c) interacción de células tumorales con plaquetas;
- d) adhesión al endotelio vascular y
- e) proliferación.

Tanto el bloqueo de integrinas (utilizando anticuerpos o péptidos que contienen la secuencia RGD (-Arg-Gly-Asp-)) como modificaciones inducidas en la expresión de moléculas asociadas a integrinas pueden inhibir la formación de metástasis. El descubrimiento y caracterización de moléculas que regulen la capacidad adherente de las células tumorales conducirá al desarrollo de terapias antimetastásicas. En la búsqueda de inhibidores de la diseminación tumoral, las integrinas y algunas moléculas asociadas a integrinas son importantes blancos farmacológicos (Velasco y cols., 1999).

Los receptores de integrinas, particularmente $\alpha_v\beta_3$ (también conocida como receptor vitronectina), unen a proteínas y péptidos conteniendo la secuencia RGD. Muchos antagonistas de la vitronectina inhiben la angiogénesis. Los estudios clínicos de un péptido lineal sintético con dos secuencias RGD (Arg-Gly-Asp-Ser-Cys-Arg-Gly-Asp-Ser-Tyr) marcado con Tc-99m, mostraron que el radiopéptido se elimina rápidamente por vía renal con excelentes imágenes de metástasis en nódulos linfáticos. En forma similar se diseñó un péptido antagonista de la vitronectina con dos secuencias RGD y se marcó con Tc-99m utilizando HYNIC/tricina/TPPTS (Liu y cols., 2001). En estudios preliminares con modelos animales, dicho péptido mostró una rápida depuración sanguínea con una captación tumoral de 5.5 % de la actividad inyectada por gramo de tejido una hora después de la administración.

Se han encontrado una gran variedad de integrinas sobre la superficie de células tumorales. Por ejemplo, las células de melanoma expresan $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, y $\alpha_5\beta_1$; en las células de carcinoma pulmonar se expresan $\alpha_v\beta_5$ y en muchas otras células tumorales se encuentran $\alpha_v\beta_6$.

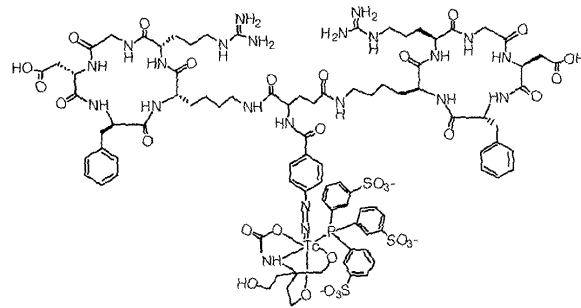


Figura 2. ^{99m}Tc -péptido antagonista de la vitronectina con dos secuencias RGD

Péptidos para detectar trombosis

Durante el rápido crecimiento de un trombo, las plaquetas activadas expresan receptores GP IIb/IIIa que reconocen péptidos y proteínas tales como fibrinógeno conteniendo el tripéptido de secuencia RGD. Varios antitrombóticos antagonistas del receptor GP IIb/IIIa marcados con Tc-99m, se han preparado y evaluado con la finalidad de obtener imágenes no invasivas de tromboembolismo. Para el diseño de estos péptidos con secuencias RGD, se han utilizado como agentes biquelantes N_2S_2 y HYNIC/tricina/ TPPTS para permitir el marcado con Tc 99m como se muestra en la figura 3.

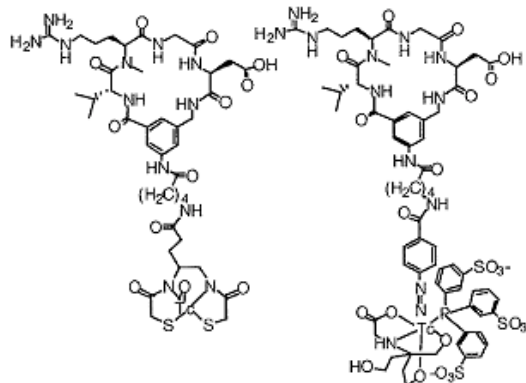


Figura 3. Péptido antagonista del receptor GP IIb/IIIa con secuencias RGD marcado con ^{99m}Tc via N_2S_2 ó HYNIC/tricina/ TPPTS

Péptidos para infección e inflamación

Los péptidos quimiotácticos marcados con Tc-99m preparados para detectar sitios de infección/inflamación, mostraron como principal limitación su potencia para producir respuestas neutropénicas severas. Los avances recientes incluyen el desarrollo de

péptidos catiónicos y antimicrobianos. El tufsin es un tetrapéptido catiónico (Tyr-Lys-Pro-Arg) derivado de la leucoquinina. A dicho tetrapéptido se le agregó una secuencia tetrapeptídica adicional con la finalidad de proveer un sitio quelante N_3S para el Tc reducido. En estudios clínicos preliminares, el ^{99m}Tc -tufsin (Fig. 4) mostró una rápida depuración renal con altas relaciones blanco/ no blanco 3 h después de su administración en pacientes con enfermedad de Crohn y artritis reumatoidea.

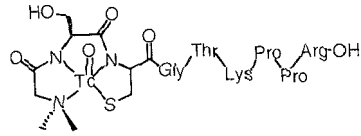


Figura 4. ^{99m}Tc -tufsin como un péptido para la detección de procesos inflamatorios.

El péptido ubiucidin (UBI), es un péptido antimicrobiano catiónico aislado de la piel humana. Específicamente el fragmento UBI 29-41 se marca con Tc-99m directamente bajo condiciones alcalinas, donde se supone que la Lys y la Arg³ forman junto con dos moléculas de agua, un sitio quelante para el tecnecio reducido (Melendez y cols., 2003) (Fig. 5). La especificidad *in vitro* e *in vivo* del ^{99m}Tc -UBI por las bacterias ha quedado demostrado, por lo que se propone como un agente específico para la detección de infecciones (Ferro y cols., 2003a). Este hallazgo significa que, a través de una imagen gammagráfica obtenida utilizando UBI 29-41 marcado con Tc-99m, se podría diferenciar un proceso infeccioso de un inflamatorio evitando el uso indiscriminado de antibióticos.

Otras biomoléculas radiomarcadas con potencial para la detección y tratamiento del cáncer de próstata y mama o para realizar un mapeo del cerebro humano entre otros, son la oxitocina, la bombesina, la neurotensina, sustancia P, proteínas transportadoras de dopamina (DAT), re el estudio de la apoptosis in vivo.

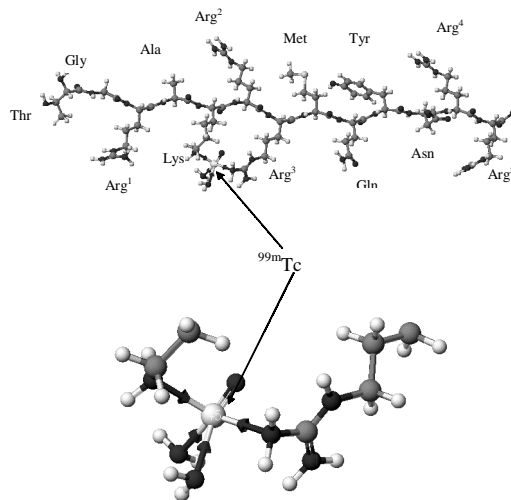


Figura 5. ^{99m}Tc -UBI (29-41): Péptido específico para diferenciar una infección de una inflamación.

Tratamiento de linfomas no Hodgkin

Se conoce como radioterapia metabólica o dirigida, al tratamiento con radiofármacos que se dirigen específicamente hacia un tumor o lesión proporcionando una dosis eficaz de radiación selectiva que destruya a las células anormales sin dañar a los tejidos sanos. La conjunción química entre una molécula acarreadora o vector, altamente selectivo, y un radionúclido terapéutico diseñados en una forma farmacéutica se denomina Radiofármaco Terapéutico.

El estado actual de la investigación y la aplicación clínica a nivel mundial evidencia que los anticuerpos monoclonales marcados para radioinmunoterapia de tumores sólidos presenta notorias limitaciones debido a la lenta cinética de incorporación en el tumor y depuración sanguínea, a la posibilidad de reacciones inmunológicas y a la baja relación tejido tumoral/tejido normal. Las terapias con anticuerpos biotinilados en tres pasos han tratado de solucionar estas limitaciones con relativo éxito, siendo la limitante la disponibilidad de cantidades adecuadas de anticuerpos con la suficiente afinidad y especificidad que permitan su uso. Sin embargo, para las aplicaciones hematológicas como los linfomas no-Hodgkin, el éxito es contundente con la aplicación combinada de anticuerpos anti-linfoma nativos y quiméricos, en combinación con el marcado con ^{90}Y .

La terapia con anticuerpos monoclonales, particularmente contra linfomas no Hodgkin, comienza a vislumbrarse como una realidad con la introducción reciente de productos comerciales marcados con ^{90}Y y con ^{131}I por parte de importantes firmas farmacéuticas. Todos ellos están dirigidos contra el antígeno de superficie CD20 ampliamente expresado en linfocitos B. Basados en la experiencia en México de marcación de biomoléculas con ^{188}Re (Ferro y cols., 1997, 1999, 2002; Meléndez y cols., 1999; Murphy y cols. 2001a, 2001b) y en la ventaja de poder disponer de este radionucleido a través de un sistema generador, se ha seleccionado este radionucleido para el desarrollo de un anticuerpo anti-linfoma útil en terapia. Por otra parte la disponibilidad de ^{131}I , a bajo costo hace que sea factible la marcación y evaluación del anticuerpo anti-CD20, de probada eficacia en el tratamiento de linfomas, con este radionucleido.

Ablación de médula ósea (m.o.) en pacientes con enfermedades malignas y candidatos a trasplante de m.o.

A la idea de administrar un radionúclido padre que tenga una vida media lo suficientemente larga que le permita a la molécula acarreadora o vector, situarse específicamente en el tejido blanco y decaer in vivo a un radionúclido hijo con propiedades potencialmente terapéuticas, se le conoce como SISTEMA DE GENERADOR IN VIVO. Idealmente, el radionúclido padre debe decaer por un proceso tal que produzca una mínima dosis de radiación a los tejidos normales, mientras que, el radionúclido hijo, debe producir una dosis de radiación destructiva al tejido blanco. Por sus propiedades nucleares, el sistema Disproσιο-166/Holmio-166 ($^{166}\text{Dy}/^{166}\text{Ho}$) podría funcionar como un sistema de generador in vivo^(3,4). El Disproσιο-166 es un emisor beta-gamma (energía beta máxima de 0.48 MeV; gamma de 0.082 MeV, 12 %; tiempo de vida media de 3.4 d), el cual decae a ^{166}Ho (energía beta máxima de 1.9 MeV ; gamma de 0.081 MeV, 5.3 % ; tiempo de vida media de 1.12 d).

En México, se ha propuesto utilizar el sistema de generador in vivo para preparar Biotina radiomarcada para el tratamiento de diversos cánceres (Ferro y cols. 2003b), así como para la liberación selectiva de dosis de radiación suficiente para producir ablación de m.o. en pacientes que requieren trasplante de la misma mediante la marcación del fosfonato EDTMP con Dy-166/Ho-166 (Pedraza y cols., 2003).

El par Dy-166/Ho-166 representa un sistema de generador con equilibrio transitorio, por lo que la actividad a cualquier tiempo puede ser calculada como:

$$A_{Dy-166} = A_{Dy-166}^0 e^{-\lambda_{Dy-166}t} \quad \text{Eq. 1}$$

$$A_{Ho-166} = \frac{\lambda_{Ho-166} A_{Dy-166}^0}{\lambda_{Ho-166} - \lambda_{Dy-166}} (e^{-\lambda_{Dy-166}t} - e^{-\lambda_{Ho-166}t}) \quad \text{Eq.2}$$

donde A_{Dy-166}^0 , representa la actividad inicial de disprosio-166 captado en el esqueleto. Si consideramos una captación ósea rápida de $^{166}\text{Dy-EDTMP}$ con una vida media biológica varias veces mayor que la vida media del radionúclido, para propósitos dosimétricos la eliminación biológica puede considerarse a tiempo infinito y la actividad acumulada en la superficie ósea puede expresarse:

$$\tilde{A}_{Dy-166}(0, \infty) = \int_0^{\infty} A_{Dy-166}(t) dt = \frac{A_{Dy-166}^0}{\lambda_{Dy-166}} \quad \text{Eq. 3}$$

la actividad acumulada de Ho-166 como:

$$\tilde{A}_{Ho-166}(0, \infty) = \int_0^{\infty} A_{Ho-166}(t) dt = \frac{\lambda_{Ho-166} A_{Dy-166}^0}{\lambda_{Ho-166} - \lambda_{Dy-166}} \left(\frac{1}{\lambda_{Dy-166}} - \frac{1}{\lambda_{Ho-166}} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

y la dosis total a médula ósea (r.m.) puede expresarse:

$$\bar{D}_{r.m.} = \tilde{A}_{Dy-166, trab.bone}(0, \infty) S_{Dy-166(r.m. \leftarrow trab.bone)} + \tilde{A}_{Dy-166, cort.bone}(0, \infty) S_{Dy-166(r.m. \leftarrow cort.bone)} + \tilde{A}_{Ho-166, trab.bone}(0, \infty) S_{Ho-166(r.m. \leftarrow trab.bone)} + \tilde{A}_{Ho-166, cort.bone}(0, \infty) S_{Ho-166(r.m. \leftarrow trab.bone)} \quad \text{Eq. 5}$$

De estas ecuaciones se deduce que por cada 2.2 MBq de $^{166}\text{Dy-EDTMP}$ captado en la superficie ósea, se producirán *in vivo* 6.69 MBq de $^{166}\text{Ho-EDTMP}$ con una dosis ablativa a médula ósea de 25 Gy (Pedraza y cols., 2003).

Referencias

- [1] Bakker W., de Jong M., Kwekkeboom D.J., et. al. (2000) $^{111}\text{In-DTPA-Tyr}^3\text{-octreotate}$: Preparation, quality control and early human application. J. Nucl. Med., 41, 286P.
- [2] de Jong M., Breeman W.A., Bakker W.H., et. al. (1998) Comparison of ^{111}In -labeled somatostatin analogues for tumor scintigraphy and radionuclide therapy. Cancer Res., 58, 437-441.
- [3] Decristoforo C. and Mather S.J. (1999) 99m-Technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: Effects of lipophilicity and stability on biodistribution. Nucl. Med. Biol., 26, 389-396.

- [4] Ferro-Flores G. and Hashimoto K. (1997) Direct Labeling of Monoclonal Antibodies and Antibody Fragments with ^{188}Re . *Radiochimica Acta*, 79: 63-70.
- [5] Ferro-Flores G., Pimentel-González G., González-Zavala M.A., et al. (1999a) Preparation, Biodistribution and Dosimetry of ^{188}Re -labeled MoAb for cea1 and its F(ab')₂ Fragments by Avidin-Biotin Strategy. *Nucl. Med. Biol.*, 26, 57-62.
- [6] Ferro-Flores G., Ramírez F. De M., Martínez-Mendoza G., et al. (2002) Peptide labeling using ^{188}Re , $^{188}\text{Re-MAG}_3$ and $^{153}\text{Sm-H}_1\text{ETA}$: a comparison on their in vitro lipophilicity. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 25, 7-13.
- [7] Ferro-Flores G., Murphy C.A., Pedraza-López M., et al. (2003a) *In Vitro* and *In vivo* Assessment of $^{99\text{m}}\text{Tc-UBI}$ Specificity for Bacteria. *Nucl. Med. Biol.*, 30: 597-603.
- [8] Ferro-Flores G., Murphy C.A., Pedraza-López M., et al. (2003b) Labeling of Biotin with [^{166}Dy]Dy/ ^{166}Ho as a Stable *In Vivo* Generator System. *Int. J. Pharmaceutics*, 255, 129-138.
- [9] Liu S., Edwards D.S., Ziegler M.C., et al. (2001) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeling of a hydrazine nicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors. *Bioconjugate Chem.*, 12, 624-629.
- [10] Meléndez-Alafort L., Ferro-Flores G., Murphy C.A., et al. (1999). Labeling Peptides with Rhenium-188. *Int. J. Pharmaceutics*, 182, 165-172.
- [11] Meléndez-Alafort L., Ramírez F. De M., Ferro-Flores G., et al. (2003) Arg and Lys in UBI: A Specific Site for a Stable $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Complex?. *Nucl. Med. Biol.*, 30:605-615.
- [12] Murphy C.A., Pedraza-López M., Ferro-Flores G., et al. (2001a) Uptake of ^{188}Re - α -naphthyl-peptide in cervical carcinoma tumours in athymic mice. *Nucl. Med. Biol.*, 28, 319-326.
- [13] Murphy C.A., Ferro-Flores G., Pedraza-López M., et al. (2001b). Labelling of Re-ABP with ^{188}Re for bone pain palliation *Appl. Radiat. Isot.* 54: 435-442.
- [14] Pedraza-López M., Ferro-Flores G., Murphy C.A. et al. (2003) Preparation of [^{166}Dy]Dy/ ^{166}Ho -EDTMP: A Potential *In Vivo* Generator System for Marrow Ablation. *Nucl. Med. Commun.*, in press
- [15] Velasco-Velázquez M.A., Molina-Guarneros J.A., Mendoza-Patiño N., et al. (1999) Integrinas y moléculas asociadas a integrinas: blancos para el desarrollo de terapias antimetastásicas. *Rev. Inv. Clin.*, 51, 183-193.