



Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Expresión y caracterización de un fragmento de anticuerpo recombinante con potencialidades para ser usado en la radioinmunoterapia de tumores CEA positivos.

Trabajo de Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Lincidio Pérez Sánchez

**Tutores: Dra. Marta Ayala Avila
Dra. Gilmara Pimentel**

**Ciudad de la Habana
2008**

Linker

V_H

CDRH3

CDRH3

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 CÁNCER.....	7
2.2 CÁNCER COLORECTAL.....	7
2.3 BLANCOS PARA LA INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER.	10
2.4 EL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO (CEA) COMO MARCADOR TUMORAL.....	11
2.5 LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcM).....	15
2.6 LOS FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS.....	17
2.7 MARCAJE DE FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS CON RADIOISÓTOPOS.....	20
2.8 BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DE LOS FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS.....	23
2.9 ENSAYOS CLÍNICOS EN CÁNCER CON ANTICUERPOS Y FRAGMENTOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1 MICROORGANISMOS.....	28
3.2 LÍNEA CELULAR DE ORGANISMOS SUPERIORES.....	28
3.3 REACTIVOS, SOLUCIONES, SUEROS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	28
3.4 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LAS REGIONES VARIABLES DEL ANTICUERPO MONOCLONAL CB/lorCEA.1.....	30
3.5 ENSAMBLAJE MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL FRAGMENTO DE ANTICUERPO ANTI-CEA.....	31
3.6 INSERCIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL FRAGMENTO ANTI-CEA EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pACR.1.....	31
3.7 SELECCIÓN DE LOS CLONES QUE EXPRESAN EL FRAGMENTO ANTI-CEA.....	33
3.7.1 <i>Trasformación e inducción de la expresión en Escherichia coli.....</i>	<i>33</i>
3.7.2 <i>Identificación de la expresión del fragmento anti-CEA en la biomasa total mediante electroforesis de poliacrilamida y Western blotting.....</i>	<i>33</i>
3.8 DETERMINACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA EN LA FRACCIÓN SOLUBLE DE LA RUPTURA CELULAR.....	34
3.8.1 <i>Extracción del fragmento anti-CEA mediante ruptura celular por ultrasonido.....</i>	<i>34</i>
3.8.2 <i>Purificación por IMAC del fragmento anti-CEA presente en la fracción soluble.</i>	<i>35</i>
3.8.3 <i>Análisis de la pureza e inmunoidentificación del fragmento anti-CEA.....</i>	<i>36</i>
3.9 PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	36
3.10 EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE NaCl EN LA PROPORCIÓN ENTRE LOS PICOS 1 Y 2 DEL FRAGMENTO ANTI-CEA.....	37
3.11 RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 AL ANTÍGENO HUMANO, MEDIANTE UN ENSAYO ELISA.....	38
3.12 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....	38
3.12.1 <i>Determinación de la afinidad mediante un ensayo Elisa no competitivo.....</i>	<i>38</i>
3.12.2 <i>Determinación de la afinidad en el BIAcore.....</i>	<i>39</i>
3.13 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 SOBRE CÉLULAS LS 174T.....	39
3.14 REACTIVIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 SOBRE CÉLULAS TUMORALES HUMANAS LS 174T MEDIANTE LA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	40
3.15 ESTUDIO SOBRE LA ESTRUCTURA DEL FRAGMENTO ANTI-CEA.....	41
3.15.1 <i>Purificación e identificación de los fragmentos anti-CEA y L15.....</i>	<i>42</i>
3.15.2 <i>Determinación del coeficiente de absortividad específica de los fragmentos de anticuerpos anti-CEA y L15.....</i>	<i>42</i>
3.15.3 <i>Mediciones de la talla molecular de los fragmentos anti-CEA y L15 a través de la difracción dinámica de luz.....</i>	<i>43</i>
3.16 ESCALADO EN LA PRODUCCIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....	43
3.17 ESTUDIO DE FORMULACIÓN Y ESTABILIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....	45
3.17.1 <i>Estudio de la Formulación.....</i>	<i>45</i>
3.17.2 <i>Estudio de la Estabilidad.</i>	<i>46</i>
3.18 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....	47
3.19 MARCAJE RADIOACTIVO DEL FRAGMENTO DE ANTICUERPO ANTI-CEA M3.	47
3.19.1 <i>Radiomarcaje del fragmento anti-CEA M3 con el isótopo 125I.....</i>	<i>48</i>

<u>3.19.2 Radiomarcaje del fragmento anti-CEA M3 con el isótopo 131I.....</u>	<u>48</u>
<u>3.20 ESTABILIDAD IN VITRO DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO.....</u>	<u>49</u>
<u>3.21 DETERMINACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO.....</u>	<u>49</u>
<u>3.21.1 Inmunoreactividad del fragmento anti-CEA M3-125I sobre células que expresan CEA.....</u>	<u>49</u>
<u>3.21.2 Inmunoreactividad del fragmento anti-CEA M3-131I contra el CEA humano en solución.....</u>	<u>51</u>
<u>3.22 ENSAYO DE COMPETENCIA PARA ESTIMAR LA AFINIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO CON 125I.....</u>	<u>51</u>
<u>3.23 EXPERIMENTOS EN ANIMALES CON EL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO.....</u>	<u>52</u>
<u>3.23.1 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 125I.....</u>	<u>53</u>
<u>3.23.2 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 131I.....</u>	<u>53</u>
<u>3.23.3 Gammagrafía en ratones con el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 131I.....</u>	<u>54</u>
<u>3.24 ESTUDIO DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO CON 131I EN PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL.....</u>	<u>54</u>
<u>3.24.1 Estabilidad en el suero de los pacientes y excreción por la orina del fragmento anti-CEA M3-131I.....</u>	<u>55</u>
<u>3.24.2 Farmacocinética del Fragmento anti-CEA M3-131I en el suero de los pacientes.....</u>	<u>55</u>
<u>3.24.3 Evidencia gammagráfica de la captación tumoral del fragmento anti-CEA M3-131I en los pacientes.....</u>	<u>56</u>
<u>3.24.4 Evaluación de anticuerpos anti-fragmento en el suero de los Pacientes.....</u>	<u>56</u>
<u>3.25 MÉTODOS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS.....</u>	<u>57</u>
<u>4. RESULTADOS.....</u>	<u>58</u>
<u>4.1 CLONACIÓN Y SECUENCIA DE LOS GENES DE LA REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA Y LIGERA DEL ANTICUERPO CB/iorCEA.1.....</u>	<u>58</u>
<u>4.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA.....</u>	<u>59</u>
<u>4.2.1 Selección de los clones que expresan el fragmento anti-CEA.....</u>	<u>59</u>
<u>4.2.2 Purificación por IMAC del fragmento anti-CEA presente en el sobrenadante de ruptura.....</u>	<u>60</u>
<u>4.2.3 Segunda Etapa de purificación por cromatografía de exclusión molecular.....</u>	<u>61</u>
<u>4.3 EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE NaCl EN LA RELACIÓN ENTRE LOS PICOS 1 Y 2.....</u>	<u>62</u>
<u>4.4 RECONOCIMIENTO DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 AL CEA HUMANO.....</u>	<u>64</u>
<u>4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....</u>	<u>64</u>
<u>4.6 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 SOBRE CÉLULAS LS 174T.....</u>	<u>65</u>
<u>4.7 RECONOCIMIENTO DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 SOBRE LAS CÉLULAS LS 174T POR CITOMETRÍA DE FLUJO (FACS).....</u>	<u>65</u>
<u>4.8 ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA DEL FRAGMENTO ANTI-CEA.....</u>	<u>66</u>
<u>4.8.1 Clonaje y Expresión de un fragmento de simple cadena conformado con un péptido de unión de 15 aminoácidos.....</u>	<u>66</u>
<u>4.8.2 Cromatografía en gel filtración de los fragmentos anti-CEA y L15.....</u>	<u>67</u>
<u>4.8.3 Determinación del Coeficiente de Absortividad específica de los fragmentos anti-CEA y L15.....</u>	<u>68</u>
<u>4.8.4 Estimación de la talla molecular de los fragmentos anti-CEA y L15 mediante difracción dinámica de luz....</u>	<u>68</u>
<u>4.9 ESCALADO DE LA PRODUCCIÓN DEL FRAGMENTO HASTA 5 LITROS DE FERMENTACIÓN.....</u>	<u>69</u>
<u>4.10 ESTUDIO DE FORMULACIÓN Y DE ESTABILIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....</u>	<u>72</u>
<u>4.10.1 Formulación del fragmento anti-CEA M3.....</u>	<u>72</u>
<u>4.10.2 Estudio de Estabilidad del fragmento anti-CEA M3.....</u>	<u>73</u>
<u>4.11 SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS POR ESPECTROMETRÍA DE MASA DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....</u>	<u>74</u>
<u>4.12 RADIOMARCAJE DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 CON 125I Y 131I. ESTABILIDAD DEL RADIOMARCAJE IN VITRO.....</u>	<u>75</u>
<u>4.13. INMUNOREACTIVIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO CON YODO.....</u>	<u>76</u>
<u>4.14 EFECTO DEL RADIOMARCAJE CON 125I SOBRE LA AFINIDAD DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3.....</u>	<u>78</u>
<u>4.15 BIODISTRIBUCIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO EN MODELOS ANIMALES.....</u>	<u>79</u>
<u>4.15.1 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 125I en ratones atómicos.....</u>	<u>79</u>
<u>4.15.2 Biodistribución del fragmento radiomarcado con 131I en ratones atómicos.....</u>	<u>81</u>
<u>4.15.3 Gammagrafía en ratones atómicos con el fragmento anti-CEA-131I.....</u>	<u>82</u>
<u>4.16 ESTUDIO DEL FRAGMENTO ANTI-CEA RADIOMARCADO CON 131I EN PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL.....</u>	<u>83</u>
<u>4.16.1 Estudio de la estabilidad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 131I en el suero de los pacientes.....</u>	<u>84</u>
<u>4.16.2 Excreción en la orina de la actividad inyectada a los pacientes.....</u>	<u>85</u>
<u>4.16.3 Farmacocinética del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 131I en Pacientes con cáncer colorectal.....</u>	<u>85</u>
<u>4.16.4 Evidencias Gammagráficas de la captación tumoral del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con 131I.....</u>	<u>87</u>

5. DISCUSIÓN	89
5.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3	89
5.2 ANÁLISIS DE LA CONFORMACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3	92
5.3 ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3	95
5.4 PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3	96
5.5 RADIOMARCAJE DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 CON YODO Y EXPERIMENTOS DE ESTABILIDAD Y BIODISTRIBUCIÓN	97
5.6 EVALUACIÓN DEL FRAGMENTO ANTI-CEA M3 RADIOMARCADO CON ¹³¹ I EN PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL	103
6. CONCLUSIONES	106
7. RECOMENDACIONES	107
8. REFERENCIAS	108
IMAC	126
<i>Gel Filtración</i>	126
<i>Filtración Esterilizante</i>	126

Lista de Abreviaturas y Acrónimos

Por orden alfabético:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AcM	Anticuerpo Monoclonal
ARN	Ácido ribonucleico
a _s	Coeficiente de absortividad específica
BC	Capilar sanguíneo (del inglés: <i>Blood Capilar</i>)
BCA	Ácido bicinronínico (del inglés: <i>Bicinchroninic acid</i>)
BCP	Banco de células primario
BCT	Banco de células de trabajo
BGP	Glicoproteína biliar
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés: <i>Bovine Serum Albumin</i>)
CDR	Región determinante de la complementariedad (del inglés: <i>Complementary Determination Region</i>)
CEA	Antígeno carcinoembrionario (del inglés: <i>Carcinoembryonic Antigen</i>)
CENTIS	Centro de Isótopos
CENPALAB	Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio
CGM	Moléculas asociadas a granulocitos (del inglés: <i>Cells Granulocites Molecule</i>)
CL	Lúmen del colon (del inglés: <i>Colon Lumen</i>)
DAB	Diamino bencidina
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (del inglés: <i>Epidermal growth factor</i>)
ELISA	Ensayo inmunoenzimático de fase sólida (del inglés: <i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>)
FACS	Citometría de flujo (del inglés: <i>Fluorecein Analysis Cell Sorting</i>)
FDA	Administración de drogas y alimentos (del inglés: <i>Food and Drug Administration</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteína (del inglés: <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
HAMA	Anticuerpos humanos anti-ratón (del inglés: <i>Human Antimouse Antibodies</i>)
HEPES	4-(2-Hidroxietil) piperazina-1-acido etanesulfónico
HER-2	Receptor 2 del epitelio humano (del inglés: <i>Human Epitelial receptor-2</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés: <i>Hight Performance Liquid Chromatography</i>)
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IgC-like	Dominio constante de la inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IgV-like	Dominio variable de la inmunoglobulina
IPTG	Isopropiltiol-β-D-galactósido
IMAC	Cromatografía de afinidad por metales (del inglés: <i>Immunoaffinity metal Chromatography</i>)
LacZ	Promotor para la trascricpción de la β-galactosidasa.
LB	Medio Luria Bertani
MIRD	Dosis medica de radiación interna (del inglés: <i>Medical Internal Radiation Dose</i>)
NCA	Antígeno no específico de reactividad cruzada (del inglés: <i>No Cross-reactive Antigen</i>)
NMRI	Nombre que identifican una cepa de ratón

Ni-NTA	Níquel unido al ácido nitrilotriacético
OPD	Ortofenilendiamina (del inglés: <i>Orthophenilendiamine</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
peIB	Peptato liasa B (Péptido señal proveniente de <i>Erwinia carotovora</i> usado para dirigir la proteína al espacio periplasmático de <i>E.coli</i>)
PJS	Síndrome de Peutz-Jeghers (del inglés: <i>Peutz-Jeghers Síndrome</i>)
PSG	Glicoproteína específica de gestación
PVC	Cloruro de polivinilo
RBS	Sitio de unión al ribosoma (del inglés: <i>Ribosome Binding Site</i>)
RPMI	Medio de cultivo (del inglés: <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
scFv	Fragmento variable de simple cadena (del inglés: <i>Single chain variable Fragment</i>)
SDS-Page	Electroforesis en gel de poliacrilamida (del inglés: <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gels electrophoresis</i>)
TAA	Antígenos Tumor asociados (del inglés: <i>Tumor Associate Antigen</i>)
TAT	Terapia alfa dirigida (del inglés: <i>Targeted Alpha Therapy</i>)
TCA	Acido tricloroacético (del inglés: <i>Tricloroacetic acid</i>)
TGL	Lúmen de la glándula tumoral
TSA	Antígenos Tumor Específicos (del inglés: <i>Tumor specific antigen</i>)
VEGF	Factor de crecimiento endotelial de los vasos sanguíneos (del inglés: <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>)
VH	Región variable de la cadena pesada (del inglés: <i>Variable Heavy</i>)
VL	Región variable de la cadena ligera (del inglés: <i>Variable Light</i>)
YTBS	medio de cultivo con levadura, triptona, cloruro de sodio, betaina y sorbitol
2xYT	medio de cultivo con levadura, triptona y cloruro de sodio

Síntesis

Las limitaciones que presentan los anticuerpos monoclonales de ratón para su uso en la radioinmunoterapia han estimulado la búsqueda de moléculas más pequeñas derivadas de los mismos, que generalmente presentan una mayor permeabilidad a los tejidos, menor tiempo de vida media en sangre y menor inmunogenicidad.

Una de las múltiples variantes que se estudian actualmente para lograr este propósito son los fragmentos de anticuerpos en su conformación dimérica, los que por sus características pueden satisfacer las expectativas anteriores, y además mantienen la afinidad funcional del anticuerpo monoclonal original al recrear los dos sitios de unión al antígeno.

En el presente trabajo se describe la obtención de un fragmento de anticuerpo dimérico, denominado fragmento anti-CEA M3, con el cual se pretende superar las limitaciones de biodistribución y inmunogenicidad que presenta el anticuerpo monoclonal de ratón CB/iorCEA.1 para su empleo en la radioinmunoterapia del cáncer. El fragmento de este anticuerpo se construyó mediante la unión de las regiones variables de cadena pesada y ligera con un péptido de 5 aminoácidos.

El fragmento anti-CEA M3 se expresó de forma activa en el periplasma de *E. coli* y se purificó mediante cromatografías de afinidad a iones metálicos y de exclusión molecular, lográndose establecer un proceso de producción a escala de 5 Litros de fermentación con un rendimiento final de 3 mg/L de fragmento dimérico. La especificidad de este fragmento por su antígeno se evaluó por ELISA, inmunofluorescencia y citometría de flujo, mientras la afinidad se determinó en un ELISA de competencia y en el BIAcore.

El fragmento anti-CEA M3 se logró marcar con alta eficiencia a los isótopos radioactivos ¹²⁵I y ¹³¹I a través del método de la cloramina T, alcanzándose elevada estabilidad durante los marcajes. La molécula radiomarcada mantuvo la inmunorreactividad y afinidad por el CEA similar al anticuerpo completo. Experimentos en ratones atímicos xenotransplantados con células tumorales humanas LS 174T demostraron una acumulación específica de este fragmento en el tumor y una baja acumulación en el resto de los tejidos.

Los primeros resultados obtenidos en el marco de un ensayo clínico fase I con el fragmento anti-CEA radiomarcado con ¹³¹I en pacientes con cáncer colorectal indicaron que el fragmento no produce eventos adversos y no origina inmunogenicidad 1 mes después de la administración. Durante las imágenes gammagráficas se demostró que no se acumula inespecíficamente en los órganos no blancos mientras ocurre una acumulación específica en el tumor. Estos resultados sugieren las posibles ventajas del fragmento sobre el anticuerpo original al usarse en la radioinmunoterapia del cáncer.

1. Introducción

El cáncer es el resultado inevitable del fracaso de los procesos y mecanismos responsables de controlar la proliferación y la muerte celular. Esta enfermedad constituye la segunda causa de muerte en la mayoría de los países y cada año el número de pacientes tiende a incrementarse como resultado de múltiples factores entre los cuales se destacan los malos hábitos de vida (consumo de tabaco, obesidad y sedentarismo) y la predisposición genética (Peto, 2001). En Cuba también es la segunda causa de muerte siendo superada solo por las enfermedades cardiovasculares (Torres Vidal y col., 2005).

Entre todos los tipos de cáncer, el adenocarcinoma colorectal es uno de los que presenta mayor incidencia y mortalidad, superado solamente por el cáncer de pulmón que ocupa el primer lugar en ambos sexos así como por el cáncer de mama en la mujer y el cáncer de próstata en el hombre (Gralow y col., 2008).

Muchos de los métodos disponibles actualmente para el tratamiento del cáncer, tales como la radioterapia y la quimioterapia, presentan el inconveniente de que no solo actúan sobre las células neoplásicas, sino que afectan considerablemente al resto de las células del cuerpo y provocan numerosos efectos indeseados. Esta es una de las razones por las cuales la inmunoterapia basada en anticuerpos o fragmentos de ellos recibe de la comunidad científica una atención especial, ya sea para su aplicación como moléculas desnudas o conjugadas a drogas, toxinas e isótopos radioactivos (Sharkey y Goldenberg, 2006).

Está demostrado que la capacidad de los anticuerpos de reconocer específicamente a su antígeno, puede convertirse en una herramienta muy efectiva en el combate del cáncer y sus metástasis, al emplearlos con el objetivo de dirigir el tratamiento seleccionado directamente hacia el tumor (McCarron y col., 2005; Sharkey y Goldenberg, 2006). Además, al tener en cuenta el hecho de que en la actualidad han sido identificados algunos antígenos que se encuentran sobre expresados en ciertos tipos de células tumorales y que pueden ser empleados como blancos terapéuticos, lo cual aumenta las posibilidades de éxito (Wu y Senter, 2005).

Los primeros trabajos en esta dirección se realizaron con anticuerpos monoclonales de origen murino obtenidos por la fusión de linfocitos de ratón con células de mieloma, como resultado de los descubrimientos realizados por Köhler y Milstein en 1975. Estos anticuerpos se caracterizan por presentar altas afinidades y ser muy específicos a su antígeno, por lo cual se convirtieron en reactivos sumamente útiles, sobre todo al ser empleados para el diagnóstico de diversas enfermedades, incluidas las oncológicas. Sin embargo, su uso como agente terapéutico ha estado limitado debido a la elevada inmunogenicidad que suelen presentar, el poco tiempo de vida media en suero comparados con los anticuerpos humanos y la ausencia de una

interacción eficiente con las células efectoras del sistema inmunológico humano (Wu y Senter, 2005).

Como respuesta a estas restricciones se desarrolló una nueva generación de anticuerpos, a partir de la introducción de las técnicas del ADN recombinante en la modificación y/u obtención de los mismos. Mediante esta tecnología se logró quimerizar o humanizar los anticuerpos monoclonales de ratón ya existentes y trabajar en la obtención de nuevos anticuerpos completamente humanos (Lonberg, 2005).

La aplicación de la ingeniería genética a los anticuerpos también permitió la generación de fragmentos a partir de los mismos, lográndose obtener mediante esta metodología un amplio espectro de moléculas, muchas de las cuales conservan la capacidad de reconocer al antígeno al quedar intactas las regiones variables del anticuerpo parental (Bird y col., 1988).

Los fragmentos presentan propiedades farmacocinéticas que para muchas aplicaciones son consideradas ventajosas en comparación con los anticuerpos completos, como por ejemplo, presentan una mayor y más homogénea penetración tumoral, tienen mayor velocidad de aclaramiento sanguíneo que los anticuerpos humanos y en algunos casos, menor que los anticuerpos de ratón y son menos inmunogénicos (Chester y col., 2004, Kenanova y col., 2005, Sharkey y Goldenberg, 2006).

Dentro de los tipos de fragmentos que han sido desarrollados, una de las variantes más usadas ha sido el fragmento de anticuerpo de simple cadena (scFv), el cual se obtiene mediante la unión de los dominios de la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo en una misma molécula, a través de un polipéptido cuya composición de aminoácidos le confiere suficiente flexibilidad para que ambos dominios se plieguen y reproduzcan el sitio de unión al antígeno (Robinson y col., 1998).

Al igual que los anticuerpos completos, los fragmentos de simple cadena mantienen la especificidad por el antígeno. Sin embargo, el hecho de presentar una conformación monovalente significa una severa limitación para su aplicación en algunas terapias al reducirse el tiempo de retención en el blanco, sobre todo debido al incremento en la velocidad de disociación con el antígeno, y además por el aumento en la velocidad de aclaramiento de la circulación sanguínea, que es favorecida por la filtración renal debido a su pequeño peso molecular (aproximadamente entre 25 y 30 kDa) (Goel y col., 2001).

Para solucionar estos problemas los fragmentos de simple cadena se han manipulados genéticamente para obtener estructuras multivalentes, las cuales pueden ser: diméricas, triméricas o tetraméricas, incrementando de esta forma la afinidad funcional (disponen de dos o mas valencias) y el tiempo de vida media en sangre (tamaño entre 60 y 120 kDa) (Tomlinson y Holliger, 2000; Todorovska y col., 2001).

La formación de los fragmentos multivalentes puede realizarse mediante uniones covalentes o no covalentes. El uso de hélices anfipáticas (Pack y Plückthun, 1992), el empleo del dominio CH3 de las inmunoglobulinas (Hu y col., 1996; Yazaki y col., 2001) o el empleo de cisteínas que forman puentes disulfuro (Fitzgerald y col., 1997), con el objetivo de unir los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo, darán lugar a uniones covalentes. Cuando se unen dos fragmentos monovalentes con un péptido de unión adicional al que ya existe entre los dominios variables del anticuerpo o se reduce el número de los aminoácidos que componen el péptido de unión entre las regiones variables de cadena pesada y ligera, se obtienen fragmentos multivalentes mediante uniones no covalentes (Holliger y col., 1993; Schmidt y col., 1996; Goel y col., 2000).

Se ha demostrado que en una molécula monomérica la reducción en la longitud del péptido de unión entre las regiones variable es suficiente para evitar que se forme un dominio funcional, lo cual facilita la interacción iónica entre varias moléculas para formar el sitio de unión al antígeno, una reducción del péptido de unión desde 15 hasta 3-12 aminoácidos origina moléculas con una conformación mayoritariamente dimérica, mientras que péptidos de unión con 1 ó 2 aminoácidos darán lugar a fragmentos con conformaciones preferentemente triméricas (Holliger y col., 1993; Kortt y col., 2001).

Los fragmentos de anticuerpos, al igual que ha sucedido con los anticuerpos completos pueden ser usados en la inmunoterapia del cáncer conjugados con un amplio rango de productos, incluyendo enzimas, toxinas, drogas e isótopos radioactivos (Hudson, 1999).

En los últimos años la cantidad de ensayos clínicos con fragmentos de anticuerpo se han incrementado considerablemente, y ya en el año 2006 es aprobado el primer fragmento de anticuerpo recombinante (tipo Fab, nombrado Lucentis) proveniente de un anticuerpo anti-VEGF para su uso en la degeneración macular asociada a la edad (Pieramici y Avery, 2006).

Para la producción de fragmentos han sido empleados varios sistemas de expresión, los cuales van desde las células de mamíferos hasta las plantas transgénicas, los rendimientos han dependido del vector empleado, la cepa utilizada y muy estrechamente de las secuencias aminoacídicas específicas de cada anticuerpo (Plückthun, 1991).

En el caso de las bacterias, existen trabajos que demuestran la posibilidad de obtener altos rendimientos en la producción de fragmentos de anticuerpo dirigidos al periplasma de *E. coli*, apoyándose en una tecnología de cultivo incrementado, donde logran elevadas densidades celulares (Horn y col. 1996).

Uno de los antígenos que más se han estudiado para el diagnóstico y/o la terapia de diferentes tipos de carcinomas es el antígeno carcinoembrionario (CEA) descrito por primera vez por Gold y Freedman en 1965.

El CEA es una glicoproteína muy estable, perteneciente a la familia de las inmunoglobulinas, que se encuentra altamente expresada en tumores de origen epitelial y que tiene una expresión restringida en los tejidos normales (Hörig y col., 2000).

En Cuba se generó el anticuerpo monoclonal de ratón CB/iorCEA.1 en el año 1989 por Tormo y col., siguiendo la metodología descrita por Köhler y Milstein en el año 1975. Este anticuerpo es de subclase IgG1 y durante su caracterización demostró tener una alta especificidad y afinidad al CEA, lo cual abrió el camino hacia su aplicación en el diagnóstico al ser empleado como molécula radiomarcada con el isótopo ^{99m}Tc . Después de varios ensayos clínicos el mismo se registró en Cuba y otros países para el diagnóstico de tumores colorectales y sus recidivas, (Pimentel y col., 2001; Pimentel y col., 2004; Oliva y col., 2005).

Sin embargo, su aplicación en la radioinmunoterapia ha estado limitada ya que presenta una elevada acumulación no específica, fundamentalmente hepática, y a la generación en los pacientes de respuesta anti-inmunoglobulina de ratón (Pimentel y col., 2004; Oliva y col., 2005).

Estimulados por las buenas cualidades demostradas por el anticuerpo CB/iorCEA.1, referidas a su alta especificidad y afinidad por el antígeno, y con el conocimiento de las limitaciones que presenta para su empleo en la terapia, las cuales pudieran ser superadas con el uso de un fragmento que permita su aplicación en la radioinmunoterapia, se planteó la siguiente **hipótesis**: Es posible generar y expresar de forma activa en el periplasma de *E. coli* un fragmento dimérico proveniente del anticuerpo CB/iorCEA.1, que conserve la especificidad por el antígeno carcinoembrionario después de conjugado con yodo radioactivo, y se localice de manera preferencial en los tumores CEA positivos.

Objetivo General.

Obtener por vía recombinante en el periplasma de *Escherichia coli* un fragmento de anticuerpo en forma dimérica, que conserve la especificidad por el antígeno CEA humano y que aporte evidencias de su posible superioridad con relación al anticuerpo original para ser empleado en la radioinmunoterapia del cáncer colorectal.

Objetivos específicos:

1. Demostrar la expresión en la bacteria *Escherichia coli* del fragmento de anticuerpo. Purificar y caracterizar el fragmento dimérico proveniente del anticuerpo monoclonal de ratón CB/iorCEA.1. en cuanto a su especificidad, afinidad y estabilidad. Establecer su producción a escala de 5 litros de fermentación.

2. Demostrar que el fragmento de anticuerpo dimérico mantiene la estabilidad después de radiomarcado con yodo 125 y 131 por el método de la cloramina T y mantiene la especificidad por el antígeno carcinoembrionario similar al anticuerpo completo. Además, que el fragmento se acumula predominantemente en el tumor durante los experimentos de

biodistribución en ratones atómicos xenotrasplantados con células humana de tumor de colon LS 174T.

3. Obtener las primeras evidencias de la prueba de concepto en pacientes con cáncer colorectal.

Para el cumplimiento de estos objetivos, se acometieron las siguientes **tareas**:

- Clonar a partir del ARN del hibridoma que produce el anticuerpo CB/iorCEA.1, los genes que codifican para las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de este anticuerpo. Determinar las secuencias consensos de los genes.
- Diseñar y clonar en el vector de expresión plasmídico pAcR-1 el gen que codifica para el fragmento de anticuerpo de cadena única, uniendo los genes de las regiones variables pesada y ligera mediante un péptido de unión de 5 aminoácidos.
- Transformar la cepa de *E. coli* RV 308 con el vector plasmídico conteniendo el gen del fragmento, seleccionar un clón por expresión y purificar mediante afinidad por iones metálicos y exclusión molecular.
- Caracterizar el fragmento de anticuerpo en cuanto a su identidad y pureza, así como realizar estudios de especificidad y de afinidad *in vitro*.
- Establecer un proceso de fermentación y ajustar la metodología para la producción del fragmento dimérico a escala de 5 litros. Preparar y caracterizar los bancos de células.
- Estudiar la formulación y la estabilidad del fragmento de anticuerpo dimérico.
- Ensayar el método para el marcaje radioactivo con yodo 125 y 131 y analizar el efecto del marcaje en la estabilidad y la inmunorreactividad del fragmento.
- Realizar el estudio de la biodistribución del fragmento radiomarcado en ratones atómicos xenotrasplantados con células humana de tumor de colon LS 174T.
- Obtener las primeras evidencias para la posible utilidad del fragmento radiomarcado en la terapia mediante el análisis de la seguridad, estabilidad, farmacocinética y biodistribución en pacientes con tumores colorectales.

La novedad científica del trabajo esta basada en el hecho de que por primera vez en el mundo se logró obtener, usando técnicas de ingeniería genética, un fragmento dimérico a partir de las regiones variables del anticuerpo CB/iorCEA.1, el cual se expresó de forma activa en el periplasma de *E.coli*. El fragmento dimérico mantuvo la especificidad y afinidad por el antígeno carcinoembrionario similar al anticuerpo original después de ser radiomarcado con yodo 125 y 131. En los experimentos *in vivo* demostró una biodistribución superior al anticuerpo completo con la acumulación preferencial en el tumor y una baja retención en órganos no relacionados, lo cual avala la posibilidad de usarlo en la radioinmunoterapia del cáncer.

La importancia teórica del trabajo es que permitió profundizar los conocimientos sobre la estructura de la molécula de inmunoglobulina y sus fragmentos y además sobre algunos de los factores que pueden influir en su reordenamiento y conformación final. En el trabajo se informa la obtención durante la purificación por cromatografía de exclusión molecular, de una fracción monomérica de este anticuerpo que coeluye con el dímero y que presenta actividad biológica, hecho no reportado anteriormente en el mundo para fragmentos de anticuerpo de simple cadena construidos con péptidos de unión de 5 aminoácidos.

Desde el punto de vista práctico la ejecución de este trabajo ha permitido establecer en Cuba la tecnología para la obtención de fragmentos de anticuerpos multivalentes en bacterias, así como dejar establecido un procedimiento para la producción de este tipo de molécula a escala de 5 litros. Fue necesario incorporar dentro de las instituciones y grupos participantes todo un arsenal de nuevas tecnologías que profundizan el desarrollo científico de las mismas. Por primera vez se logró en el país obtener un proceso para el radiomarcaje con yodo de un fragmento de anticuerpo en forma estable, sin que durante este proceso se afectara significativamente la inmunorreactividad del mismo por el antígeno.

Los resultados expuestos en la tesis están contenidos en una patente aprobada en Cuba, Rusia, China, Malasia, Sudáfrica y Argentina, y forman parte de tres publicaciones: una publicación en la revista *Biotechnology Applied Biochemistry*, una publicación en la revista *Word Nuclear Medicine*, una publicación en la revista *Minerva Biotecnológica*, además han sido presentados en 8 eventos internacionales, tanto en Cuba como en el extranjero.

2. Revisión Bibliográfica

2.1 Cáncer

El cáncer es uno de los principales problemas de salud que enfrenta actualmente la humanidad, y constituye una de las primeras causas de muerte a escala mundial. Esta enfermedad se caracteriza por el crecimiento y la expansión desenfrenada de células que han sufrido una transformación genética. Los factores que lo causan pueden ser externos (consumo de tabaco, exposición a compuestos químicos y radiaciones o infecciones con virus) o internos (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunológicas y mutaciones que ocurren a partir del metabolismo) (Cancer Facts & Figures, 2007). Estos factores pueden actuar independientes o en conjunto para iniciar o promover la formación de células cancerosas mediante la desviación de un amplio espectro de vías efectoras y regulatorias, y es su enorme complejidad lo que dificulta el desarrollo de terapias efectivas y específicas (Gralow y col., 2008). No obstante, muchos tipos de cáncer pueden ser prevenidos, sobre todo aquellos que derivan del abuso del tabaco y los relacionados con la nutrición, la obesidad, la inactividad física y las infecciones por virus (Peto, 2001). Sin embargo, uno de los más potentes carcinógenos es la edad, y el hecho de que se incrementen las expectativas de vida de la población hace aumentar considerablemente los valores de incidencia de esta enfermedad (DePihno, 2000).

Todos los tumores involucran el mal funcionamiento de los genes que controlan la división y el crecimiento celular. Cerca de un 5-10% de los tumores son hereditarios, y aquellas personas que han heredado determinados genes mutados son más susceptibles a desarrollar un cáncer (Ponder, 2001). El resto de los tumores son debido a mutaciones en determinados sitios que activan los genes relacionados con el control del crecimiento y la división celular, generalmente como consecuencia de factores externos (Weber, 2002).

El cáncer puede ser tratado mediante cirugía, radiaciones, hormonas, quimioterapia e inmunoterapia, aunque en la práctica lo más usual es una combinación de varias estrategias en dependencia del tipo y estadio de desarrollo del mismo (Oyen y col., 2007; Gralow y col., 2008).

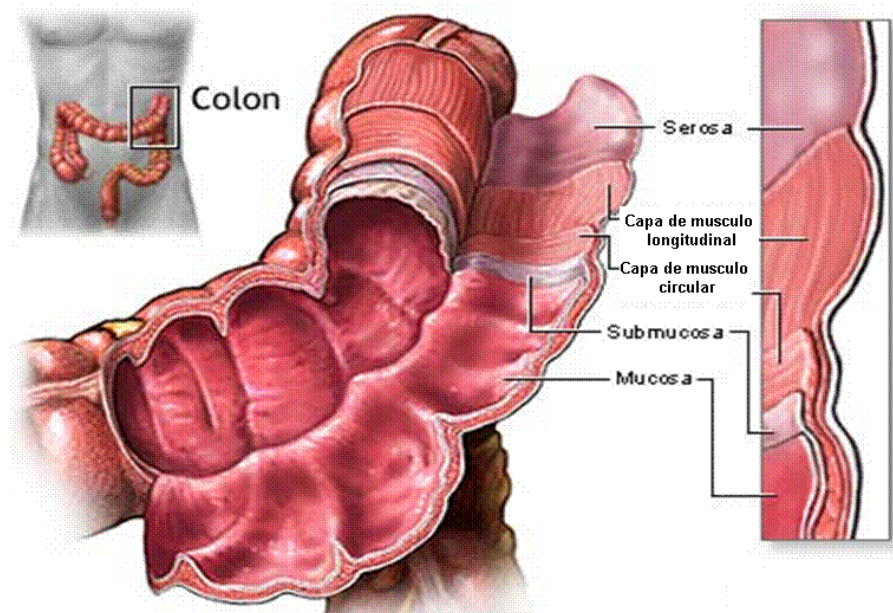
2.2 Cáncer colorectal.

El cáncer de colon consiste en el crecimiento y la expansión descontrolada de células anormales del colon, las cuales pueden invadir y destruir el tejido que les rodea. Estas células al penetrar al torrente sanguíneo o linfático pueden expandirse y afectar a otros órganos, y provocar el proceso conocido como metástasis (Hill y col., 1978).

El colon, o intestino grueso, así como el recto son componentes esenciales del sistema digestivo. En el colon continúa la absorción de agua y nutrientes de los alimentos y sirve de contenedor del material de desecho. Este material avanza hasta el recto, donde es expulsado al exterior a través del ano. El colon está dividido en cuatro segmentos: ascendente, transversal,

descendente y sigmoide, este último se encuentra unido al recto. Tanto el colon como el recto están formados por varias capas de tejido (la mucosa, submucosa, la capa muscular circular, la capa muscular longitudinal y la serosa), (Ades y col., 2005) (Figura 1). En caso de existir un tumor su pronóstico de evolución dependerá de la ubicación y del grado de afectación de una u otra capa de tejido.

Figura 1: Ubicación anatómica y estructura del colon. Se muestran las diferentes capas que recubren el colon. En caso de tumoración el pronóstico de evolución estará en dependencia de la ubicación original del tumor.



El cáncer de colon se encuentra entre las tres primeras causas de muerte por cáncer a nivel mundial. Esta enfermedad es generalmente diagnosticada en un estadio avanzado (entre el 22% y 36% de los casos), lo que provoca que el índice de supervivencia en estos casos sea muy bajo. Sin embargo, es reconocido que la tasa de supervivencia hasta cinco años se eleva hasta un 90% en aquellas personas donde se logra un diagnóstico temprano de la enfermedad, lo cual desafortunadamente ocurre solo en 37% de los casos. Si en el momento del diagnóstico el tumor se ha diseminado por órganos o ganglios linfáticos cercanos, la tasa de supervivencia cae hasta un 65%, y si se ha extendido por órganos distantes, la tasa de supervivencia hasta los cinco años es solamente de un 8% (Ries y col., 2001).

En los Estados Unidos y demás países desarrollados la incidencia del cáncer colorectal ha disminuido en las dos últimas décadas, pasando de 66,3 casos por cada 100 000 habitantes en el año 1985 hasta 49,5 casos en el 2003, como resultado principalmente del incremento en los pesquisajes que permiten la detección temprana y la eliminación de los pólipos colorectales (Ahmedin Jemal y col., 2006).

En nuestro país se produjeron 1 392 nuevos casos en el año 2001 y la mortalidad provocada por este tipo de cáncer fue de 12,54 por cada 100 000 habitantes por año (Silva y col., 2001). Sin embargo, hay una tendencia al incremento, pues ya en el año 2003 el número de defunciones se elevó a 1 568 lo que constituyó el 8,6% del total de fallecidos para ese año, con un aporte dos veces mayor del sexo femenino con respecto al sexo masculino. En términos de tasas crudas, la mortalidad por cáncer de colon se elevó en Cuba de 6,6 defunciones por 100 000 habitantes en 1979 hasta 13,9 en el año 2003 (Torres Vidal y col., 2005). En el año 2006 la incidencia era de 1 792 casos, mientras que la mortalidad en ambos sexos se elevó a una proporción de 17,7 fallecidos por cada 100 000 habitantes (Estadísticas de salud en Cuba, 2007).

Aproximadamente más del 90% de los tumores malignos colorectales son adenocarcinomas. Los cuales son tumores que se producen en las células glandulares que recubren el interior del colon y el recto (American Cancer Society, Colorectal Cancer Facts & Figuras, 2005; Pato y col., 2006).

Otro tipo de tumor que puede presentarse en el colon y recto es el estromático gastrointestinal, aunque es mucho menos frecuente, en este caso el tumor se desarrolla en el tejido conectivo y en las capas musculares que recubren la pared del colon y del recto (American Cancer Society, Colorectal Cancer Facts & Figures, 2005).

Los adenocarcinomas pueden presentar distintas formas; destacan las vegetantes, con crecimiento hacia el interior de la luz; las formas infiltrantes, que al ocupar la pared a la que infiltran producen estrecheces y retracciones, y las formas ulcerantes. Las células malignas pueden diseminarse a través de la vía linfática y la vía sanguínea. La diseminación local se realiza principalmente de forma circular alrededor de la pared intestinal infiltrando al resto de las capas, y puede producir un estrechamiento de la luz del intestino. Una vez que están afectadas todas las capas, se produce la invasión de las vías linfática y venosa. Si esa diseminación se realiza de forma longitudinal, en lugar de forma circular, la extensión se produce de manera más lenta. En un 80% de los pacientes, se produce una infiltración perineural, en los nervios de la zona, que causa dolor. El tumor puede extenderse localmente, e invade estructuras y órganos vecinos o adyacentes. Las metástasis se producen debido a que las células tumorales llegan a la sangre o a la linfa y éstas las distribuyen a otras zonas del cuerpo. Generalmente si se distribuyen a través de la sangre, suelen ser frecuentes las metástasis en hígado, pulmón y columna. Si la distribución ocurre a través de los ganglios linfáticos, se producirá probablemente metástasis en vejiga o en próstata (American Cancer Society, Colorectal Cancer Facts & Figures, 2005).

Las causas exactas del cáncer colorectal no son conocidas, aunque muchos estudios han mostrado que existe una serie de factores que incrementan el riesgo de padecer esta enfermedad, entre estos se encuentran:

- **Envejecimiento:** El cáncer colorectal debido al envejecimiento, suele ser más frecuente entre aquellas personas que rondan los cincuenta años o más de edad, aunque esto no excluye que pueda darse en personas más jóvenes (DePihno, 2000).

- **Predisposición genética:** Historial personal o familiar de pólipos o de cáncer de colon. Los pólipos son tumores benignos en las paredes internas del colon y del recto que si no son tratados a tiempo, pueden conducir a un cáncer. Alrededor del 10% de los casos de cáncer colorectal se deben a mutaciones genéticas hereditarias. Algunos síndromes hereditarios que incrementan el riesgo de padecer cáncer de colon son: (1) la póliposis adenomatosa familiar, (2) el cáncer colorectal hereditario no póliposo, (3) la póliposis juvenil familiar y (4) el síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), (Fuchs y col., 1994 y Askling y col., 2001).

- **Enfermedades inflamatorias intestinales previas:** Los individuos que hayan padecido de enfermedades inflamatorias intestinales previas pueden presentar un mayor riesgo a sufrir de cáncer colorectal (Colditz y col., 2000).

- **Historia personal de otro tipo de cáncer:** En aquellas mujeres que hayan padecido un cáncer de útero, ovario o mama, las posibilidades de sufrir cáncer de colon son mayores (Colditz y col., 2000).

- **Hábito de vida sedentaria:** Se ha comprobado en numerosos estudios que llevar una vida sedentaria favorece la aparición del cáncer (Colditz y col., 2000).

- **El consumo de dietas con poca fibra, frutas y verduras y demasiadas grasas son perjudiciales:** Los carotenoides, sustancias que se encuentran principalmente en frutas, verduras y hortalizas, tienen muchas funciones beneficiosas que minimizan el riesgo de formación de estos tumores y el refuerzo del sistema inmune, además el consumo de fibra dietética también disminuye la probabilidad de sufrir de cáncer colorectal (Colditz y col., 2000).

- **Consumo de tabaco:** Las personas que fuman 20 cigarrillos al día tienen el doble de posibilidades de desarrollar el cáncer de colon (Colditz y col., 2000).

2.3 Blancos para la Inmunoterapia del cáncer.

En los últimos años varias moléculas han sido identificadas como posibles blancos para los tratamientos del cáncer mediante inmunoterapia. Estos antígenos pueden ser agrupados en dos grandes grupos: (1) los antígenos tumor específicos (TSA) y (2) los antígenos tumor asociados (TAA) (Boon y Old, 1997; Rosenberg, 1999).

Los antígenos tumor específicos comprenden productos génicos que son expresados exclusivamente en los tumores, como ejemplos de los mismos se pueden mencionar mutaciones en el gen supresor de la proteína *p53*, mutaciones puntuales del oncogen *ras* o productos de traslocaciones génicas, tres mutaciones en el codón 12 del gen *ras* se pueden encontrar en aproximadamente el 20 o el 30% de los tumores humanos (Bos, 1989; Kiaris y Spandidos, 1999).

Los antígenos tumor asociados pueden agruparse en cinco grupos: (1) antígenos oncofetales, (2) productos de oncogenes, (3) antígenos de líneas de tejidos, (4) antígenos virales y (5) nuevos blancos (Hodge, 1996; Boon y Old, 1997; Hammarström, 1999).

Generalmente estos antígenos pueden estar o no presentes en las células normales con una expresión basal pero en presencia de procesos neoplásicos su expresión tiende a incrementarse (Hammarström, 1999).

Dentro de los antígenos oncofetales, se ubica al antígeno carcinoembrionario (CEA), expresándose solo en la fase embrionaria del organismo y con muy poca expresión de los mismos en la etapa adulta, pero que reaparecen nuevamente en las células tumorales (Kinugasa y col., 1994).

2.4 El antígeno carcinoembrionario (CEA) como marcador tumoral.

El antígeno carcinoembrionario (CEA por sus siglas en inglés: *Carcinoembryonic Antigen*) se describió por primera vez en 1965 por los investigadores P. Gold y S.O. Freedman, quienes lo purificaron a partir del extracto de tejido de cáncer colorectal. En un primer momento se postuló que era un antígeno oncofetal, el cual se expresaba solamente en la etapa embrionaria, que estaba ausente en los tejidos adultos saludables y que solo reaparecía en presencia de un tumor, donde la concentración podía ser 60 veces superior al tejido normal (Boucher y col., 1989).

La expresión del CEA en las células comienza en la etapa embrionaria y se mantiene durante toda la vida (Nap y col., 1988). Esta molécula se localiza específicamente en la superficie apical de los enterocitos maduros. Varios estudios han demostrado que el CEA es expresado tanto en los tejidos normales como en los tumores (Kinugasa y col., 1994), por lo que no debe clasificarse como un típico antígeno tumoral sino como un componente del tejido adulto normal con una expresión mantenida en los tumores. El nivel de expresión está relacionado con el grado de diferenciación celular, encontrándose una mayor expresión en los tejidos más diferenciados (Hammarström, 1999).

En unos de los primeros reportes sobre la determinación del CEA sérico Thomson y col., en el año 1969 encuentran incrementos sustanciales de sus valores en 35 de 36 pacientes con cáncer colorectal, a través de un radioinmunoensayo.

Esto hizo posible que el CEA sérico se transformara en uno de los marcadores tumorales mas usados a nivel mundial para la detección o el seguimiento post operatorio del cáncer colorectal (Duffy, 2001).

Actualmente se han descubierto más de 20 moléculas pertenecientes a la misma familia que el antígeno carcinoembrionario, tales como el antígeno no específico de reactividad cruzada (NCA) descrito por primera vez de forma independiente por von Kleist y col. y Mach y col. en 1972, la glicoproteína biliar (BGP) descubierta por T. Svenberg en 1976, la β 1-glicoproteína

específica de gestación humana (PSG) (Watanabe y col., 1988) y las moléculas asociadas a granulocitos (CGM) entre otras (Hammarström, 1999).

La familia de genes del antígeno carcinoembrionario cuenta con aproximadamente 29 genes o pseudogenes identificados hasta ahora (Olsen y col., 1994). Los genes de esta familia se clasifican en tres subgrupos: el grupo del CEA con 12 miembros, el grupo del PSG con 11 miembros y un tercer grupo con 6 miembros. Dentro del grupo del CEA, 7 de sus miembros se expresan, mientras que el resto son pseudogenes. En el grupo de PSG todos sus miembros se expresan, pero hay variantes alélicas para algunos de ellos que presentan codones de parada en el exón del dominio N. La localización de la familia de genes del CEA se encuentra en el cromosoma 19q13,2 dentro de una región de 1,8 Mb (Zimmermann y col., 1988).

El antígeno carcinoembrionario es una glicoproteína altamente glicosilada miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas con un peso molecular de 180 kDa aproximadamente (William y col., 1988).

Su estructura primaria, determinada mediante la clonación de ADNc, la constituyen 8 dominios, un dominio N-terminal de 108 aminoácidos homólogos al dominio variable de las inmunoglobulinas (IgV-like); 6 dominios homólogos al dominio constante C2 (IgC2-like) de las inmunoglobulinas denominados A1, B1, A2, B2, A3 y B3 (Figura 2), donde los dominios A tienen 93 aminoácidos y los B 83 aminoácidos; y un dominio hidrofóbico C-terminal anclado a la membrana mediante un motivo glicosil-fosfatidilinositol, que puede ser escindido por fosfatidilinositol-fosfolipasas C ó D (Boehn y col., 1996).

Precediendo al dominio N-terminal de la molécula se encuentra un péptido señal de 34 aminoácidos que es escindido de la proteína madura por una peptidasa señal antes de su exportación a la superficie celular. Esta molécula se encuentra en la superficie celular como monómero y posee un tamaño de 20x8 nm de largo por ancho respectivamente (Boehn y col., 1996).

Todos los miembros de la familia del CEA parecen mostrar dos características esenciales: (1) contienen un dominio N-terminal tipo IgG que no presenta puentes disulfuro intracatenarios, en su lugar tienen un puente salino, y (2) las moléculas están altamente glicosiladas con residuos de asparagina en su mayoría (o exclusivamente) mediante cadenas de carbohidratos tipo complejos multiantenarios (Yamashita y col., 1987; Yamashita y col., 1989).

El contenido de carbohidratos, principalmente en los residuos de asparagina, puede llegar a ser el 50% de la masa total de la proteína (Hammarström, 1999).

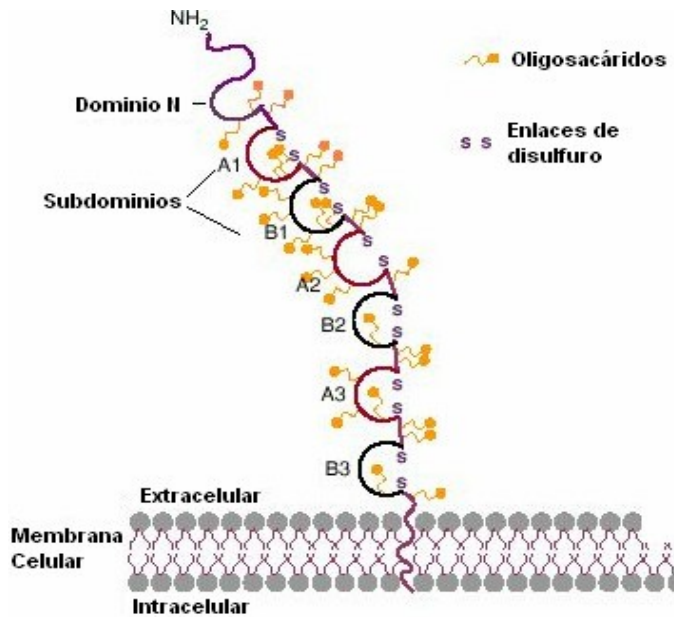


Figura 2: Representación esquemática del CEA. Se puede apreciar la glicosilación de la molécula, y la estructura de sus dominios, similares al de las inmunoglobulinas, el dominio N no presenta puentes disulfuros intracatenarios, el dominio carboxilo terminal se encuentra anclado a la membrana celular mediante un motivo glicosil-fosfatidilinositol.

Hoy se conoce que el CEA tiene una distribución limitada con respecto a los miembros de su familia en los tejidos adultos normales, encontrándose en las células epiteliales columnares y las globulares del colon, en las células de las mucosas del cuello y las mucosas pilóricas del estómago, en las células escamosas epiteliales de la lengua, esófago y cervix entre otras (Nap y col., 1988; Nap y col., 1992).

El antígeno carcinoembrionario no solo se encuentra expresado en el carcinoma colorectal (Kim y col., 1992; Jothy y col., 1993; Baranov y col., 1994), sino que puede aparecer además en otros tumores de origen epitelial (Figura 3), como son: el adenocarcinoma de pulmón (Robbins y col., 1993), el carcinoma pancreático (Shi y col., 1994), el adenocarcinoma endometrial (Hinoda y col., 1990; Tanaka y col., 1997), el de ovario y el cáncer de mama (Thompson y col., 1994).

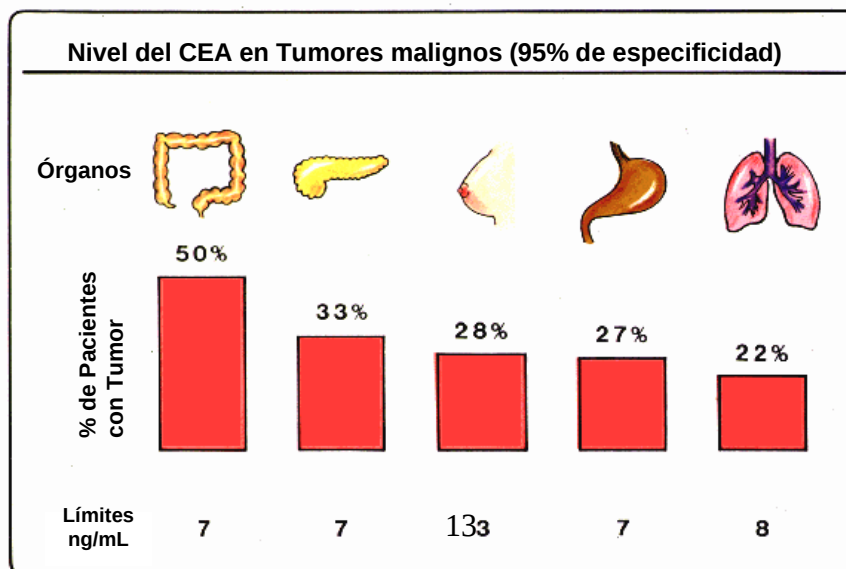


Figura 3: Expresión del antígeno CEA en diversos órganos. El CEA puede estar expresado en una serie de tumores de origen epitelial, no solo en el carcinoma colorectal, pero se ha demostrado que el 50% de los tumores colorectales lo expresan, sobre todo cuando los niveles en el suero de los pacientes sobrepasan los 7 ng/mL.

A nivel genético parece no haber diferencia entre el CEA normal y el tumoral, sin embargo una posible fuente de heterogeneidad pudiera ser debido a las diversas modificaciones post-traduccionales que pueden producirse en la proteína en dependencia de los órganos donde esta se exprese (Fritsche y col., 1977).

Las razones por la cual el CEA es extensivamente utilizado como marcador tumoral para cáncer colorectal y otros carcinomas están relacionadas a su estabilidad, su expresión restringida en tejidos normales y su elevada expresión en las células tumorales (Hammarström, 1999).

En condiciones normales la presencia de este antígeno en el suero humano es bastante baja (menor de 4 ng/mL) (Uehara y col., 2007), lo cual es debido a que en el colon normal las células epiteliales polarizadas que lo recubren expresan el antígeno sólo en la superficie apical y lo secretan hacia el lumen del mismo, lo cual facilita su eliminación en las heces, limitando su acceso a los capilares sanguíneos (Taylor y col., 1985) (Figura 4A).

En el cáncer de colon y recto, las células epiteliales que están hacia el lumen de la glándula tumoral se encuentran parcialmente polarizadas y mantienen la liberación de CEA al lumen, mientras que las células neoplásicas que están dentro del tumor pierden su polaridad y expresan CEA en toda su superficie por lo que al ser liberado puede tener acceso a los vasos sanguíneos (Figura.4B). Además, producto de la exfoliación de la membrana plasmática se liberan vesículas que drenan a través de la linfa y pueden llegar finalmente a la sangre (Taylor y col., 1985).

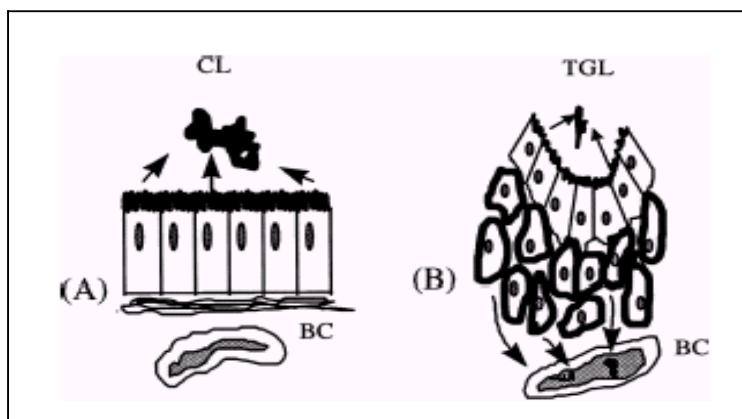


Figura 4: Principales vías de excreción de CEA en el colon normal y el cáncer de colon. A colon normal. B cáncer de colon. CL: lumen del colon. BC: capilar sanguíneo. TGL: lumen de la glándula tumoral.

Varios estudios han sugerido que existe una tendencia a correlacionar el tamaño del tumor y el aumento de los niveles de CEA en sangre (Uehara y col., 2007).

Acercas de la función biológica que desempeña el antígeno carcinoembrionario muchos estudios han demostrado que varios miembros de la superfamilia del CEA funcionan como moléculas de adhesión celular homofílicas o heterofílicas cuando se expresan en las células tumorales (Oikawa y col., 1992), y por lo tanto puede que este también sea el caso del CEA. Según reportes, el dominio N de la proteína está directamente involucrado en el fenómeno de adhesión celular (Sippel y col., 1996 y Obrink, 1997).

Es posible además, que el CEA también tenga un papel en la inmunidad innata debido a la posición estratégica que ocupa en el colon normal, este es secretado por las células globulares del colon con las mucosidades hacia la región apical de los colonocitos al igual que ocurre con el NCA. Al ser esta una molécula altamente glicosilada con cadenas de carbohidratos multiantenarias con gran cantidad de manosa y enlaces N-Acetilglucosamina con asparagina, patrón de glicosilación que tiene capacidad de interactuar con bacterias, le permite atrapar microorganismos e impedir que estos lleguen a los microvellos de las células epiteliales y las invadan. Luego, como el glicocalix se renueva constantemente en la superficie de los enterocitos, las bacterias unidas serán eliminadas junto con las heces (Leusch y col., 1990 y Leusch y col., 1991).

2.5 Los Anticuerpos monoclonales (AcM)

La tecnología de hibridomas establecida por los investigadores Kohler y Milstein en 1975 para el desarrollo de los anticuerpos monoclonales constituyó una poderosa herramienta para la obtención de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad contra un determinante antigénico y dio lugar a un crecimiento acelerado de la inmunología moderna. Los anticuerpos monoclonales aventajan a los policlonales en su homogeneidad, reproducibilidad, fuente inagotable y facilidades de purificación, lo cual ha acelerado la rápida sustitución de estos por los anticuerpos monoclonales en la mayoría de las aplicaciones inmunológicas y dio un gran impulso a la generación de anticuerpos terapéuticos (Milstein, 1999; Reichert y col., 2005).

Hasta el presente se han desarrollado dos grandes grupos de anticuerpos monoclonales, los de primera generación y los de segunda generación. Los de primera generación son los que se producen por la fusión de linfocitos B con células mieloides (células tumorales inmortales). Los híbridos resultantes de esta fusión heredan la capacidad de crecer indefinidamente *in vitro* y de producir inmunoglobulinas con una especificidad determinada (Kohler y Milstein, 1975). Los anticuerpos monoclonales de segunda generación son aquellos producidos mediante técnicas de biología molecular y ADN recombinante (Adair, 1992; Wright y col., 1992).

Los anticuerpos monoclonales tuvieron un gran éxito como reactivos analíticos debido a la alta especificidad y afinidad que presentan, pero sin embargo su aplicación con intenciones

profilácticas o terapéuticas en el hombre ha encontrado obstáculos muy importantes lo que provocó una desaceleración en su interés inicial (Oriuchi y col., 2005).

El desarrollo de la tecnología de hibridomas se realizó en células de ratón, es por este motivo que los anticuerpos monoclonales producidos a partir de ellos son de esta especie, por lo que resultan ser proteínas extrañas para el ser humano. El empleo de estos anticuerpos en el hombre promovió el surgimiento de una respuesta inmune anti-anticuerpo monoclonal (HAMA: *Human Anti-Mouse Antibodies*), lo cual afectó sensiblemente la eficacia durante su empleo terapéutico (Oriuchi y col., 2005).

La respuesta HAMA impone serias limitaciones a la extensión o repetición de la terapia basada en AcM murinos así como al empleo de altas dosis, debido a la formación de inmunocomplejos circulantes o reacciones alérgicas que son dañinas a los pacientes (Oriuchi y col., 2005).

Por otro lado estos anticuerpos pueden ser poco eficientes en la promoción de funciones efectoras por parte de las células humanas, suelen tener muy poco tiempo de vida media biológica y la biodistribución de los mismos puede verse afectada seriamente debido a los patrones de glicosilación, aspectos que van a incidir directamente en la efectividad de los mismos (Hodoniczky y col., 2005).

Para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos empleando la tecnología de hibridación celular pueden usarse linfocitos aislados de sangre periférica (Gavrilov-Yusim y col., 2008), o líneas celulares de linfocitos B inmortalizadas con el virus de *Epstein-barr* (Reichert y col., 2005). Sin embargo, la baja eficiencia en la clonación y la poca estabilidad de los clones que se obtienen ha limitado grandemente la extensión de estas tecnologías.

Estimulados por los inconvenientes señalados anteriormente para el uso de los anticuerpos monoclonales de ratón y con el desarrollo de la ingeniería genética es que surgen los anticuerpos monoclonales de segunda generación. En la actualidad estos constituyen un grupo heterogéneo de proteínas artificiales a las cuales se llega mediante dos grandes estrategias: (1) La humanización de los anticuerpos monoclonales de ratón y (2) La generación de fragmentos de anticuerpos.

La humanización de los anticuerpos monoclonales de ratón se realiza por diferentes vías:

- Anticuerpos quiméricos: Se sustituyen las regiones constantes de las inmunoglobulinas de ratón por regiones constante de anticuerpos humanos, manteniéndose intactas las regiones variables de reconocimiento al antígeno (Blanco y col., 1997).
- Anticuerpos humanizados: Se realiza la sustitución completa de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas de ratón por las humanas, y se conservan solamente las regiones determinantes de la complementariedad (CDR; *Complementary Determinant Region*)

de ratón (Rietchmann y col., 1988). Más recientemente, la sustitución de los posibles epítopes T presentes en el anticuerpo de ratón y responsables de activar la respuesta inmune en el humano (Mateo y col., 2000).

También es posible obtener anticuerpos totalmente humanos mediante el empleo de ratones transgénicos, a los cuales se les ha sustituido el repertorio genético de las inmunoglobulinas de ratón por el humano, los hibridomas obtenidos de la fusión entre los linfocitos de estos animales y células de mieloma de ratón darán lugar a la secreción de anticuerpos completamente humanos (Lonberg, 2005; Nils, 2005).

En la actualidad además, se disponen de bibliotecas génicas realizadas mediante la inserción de genes completos con repertorios de regiones variables de inmunoglobulinas humana en vectores de fagos filamentosos, lo que permite el ensamblaje de anticuerpos completos en la partícula viral y la selección de los mismos mediante ciclos de enfrentamiento al antígeno (Henderix y col., 2002).

2.6 Los Fragmentos de anticuerpos

Las limitaciones mencionadas anteriormente para el uso de los anticuerpos monoclonales de ratón en la terapia han estimulado la búsqueda de moléculas que superen estos inconvenientes, una de las variantes utilizadas ha sido la reducción del tamaño de los mismos (Bird y col., 1988). Estas moléculas presentan dentro de sus ventajas una mayor permeabilidad a los tejidos y un tiempo de vida media en sangre menor que los anticuerpos humanos completos, lo que provoca que para algunas aplicaciones pueda resultar un reactivo muy útil. Sin embargo, la ausencia de la porción efectora, cuando carecen de la región Fc, así como la ausencia de glicosilación y la disminución del tiempo de vida media en sangre, hacen que estas moléculas sean desestimadas en muchos casos para el uso en algunas terapias (Batra y col., 2002; Holliger y Hudson, 2005).

Dentro de las ventajas que presentan los fragmentos de fracción variable (Fv) y sus derivados está el hecho de que estos conservan la especificidad del anticuerpo monoclonal de origen (Holliger y Hudson, 2005) y además pueden ser producidos de manera artificial en casi todos los sistemas de expresión conocidos hasta el momento como son: las bacterias (Raag y col., 1995; Aldor y col., 2005), las levaduras (Fischer y col., 1999; Miller y col., 2005), los hongos filamentosos (Frenken y col., 1998; Pavoni y col., 2006), las células de insectos (Holvoet y col., 1991), las células de mamíferos (Rode y col., 1996) y las plantas transgénicas (Galeffi y col., 2005).

La generación de fragmentos está basada en la utilización solamente de una región de los anticuerpos, la cual estaría determinada según el uso específico del mismo. Son numerosos los métodos y las variantes de fragmentos de anticuerpos que han sido desarrolladas, estos van

desde fragmentos (Fab_2), que mantiene los dos sitios de unión al antígeno, hasta el uso de un solo CDR, como unidad menor capaz de reconocer al antígeno (Tachovsky, 1990).

Estas moléculas se pueden construir mediante el aislamiento del ARN del hibridoma secretor y su conversión a ADN con el objetivo de amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y oligonucleótidos degenerados, los genes que codifican para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo monoclonal (Le Boeuf y col., 1989). Los genes aislados y amplificados son posteriormente insertados en vectores para su secuenciación y expresión.

Otra vía de obtención de fragmentos de anticuerpos es mediante la selección a partir de bibliotecas de fagos, esta tecnología permite obtener nuevos anticuerpos sin manipular el sistema inmune natural, sólo con el traslado de los genes de inmunoglobulina humana a un sistema de fagos y bacterias (Burton y Barbas, 1994).

Los fragmentos Fv de cadena única (scFv) son moléculas que presentan un péptido de unión (linker) entre la región variable pesada y la región variable ligera. El péptido de unión debe tener una longitud que les permita a los dominios variables pesado y ligero plegarse adecuadamente para formar el sitio de unión al antígeno (Bird y col., 1988). Estos péptidos están compuestos por aminoácidos que confieren solubilidad, flexibilidad y evitan la modificación de la especificidad y afinidad del sitio de unión al antígeno (Huston y col., 1988; Robinsón y col., 1998).

Los aminoácidos que mayoritariamente conforman el péptido de unión son la serina y la glicina. La serina le confiere solubilidad y previene su internalización en regiones hidrofóbicas durante el plegamiento del fragmento, mientras que la glicina, debido a su pequeño tamaño, confiere la flexibilidad adecuada para el acomodamiento de varias conformaciones sin perturbar el acoplamiento de ambos dominios (Whitlow y col., 1993). Bajo este mismo principio, se han utilizado otros aminoácidos que cumplen la misma función tales como: lisina, ácido glutámico, prolina, alanina, treonina y metionina (Huston, 1998).

Cuando el objetivo es obtener fragmentos de anticuerpos multivalentes, con una afinidad funcional cada vez mas semejantes a los anticuerpos completos, y un mayor peso molecular, se puede manipular la dimensión del péptido de unión, para obtener fragmentos que mediante fuerzas no covalentes tienden a formar estructuras diméricas, triméricas, y tetraméricas (Kortt y col., 2001) (Figura 5).

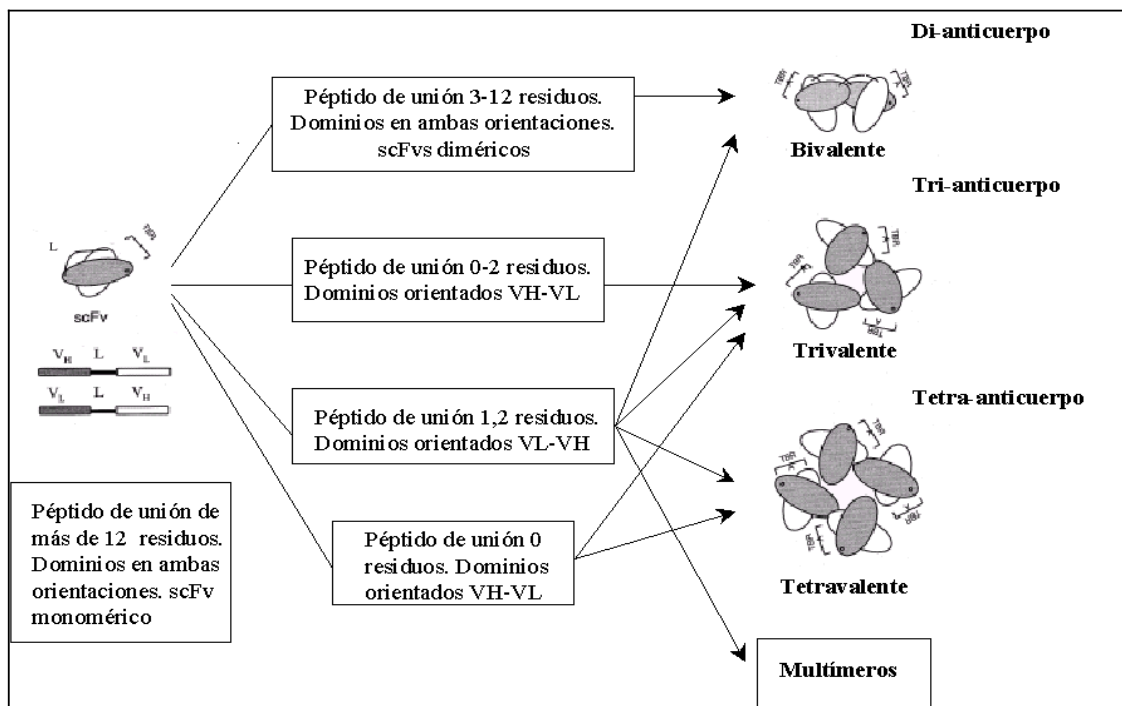


Figura 5: Influencia de la longitud del péptido de unión entre las regiones variables pesada y ligera en la conformación final de los fragmentos de anticuerpo. Para formar moléculas multiméricas en muchas ocasiones basta con variar la longitud del péptido de unión de las regiones variables del anticuerpo, pero el tipo de estructura que se obtendrá dependerá de las secuencias aminoácidas de cada anticuerpo en particular.

La conformación de un fragmento de anticuerpo dimérico modificando el tamaño del péptido para la unión de las regiones variables, provoca que una molécula requiera de otra para alcanzar su conformación estable. Los fragmentos triméricos y tetraméricos se pueden lograr al omitir el péptido de unión entre las regiones variables V_H y V_L o con el uso de sólo 1 ó 2 aminoácidos para conectar ambas moléculas, lo que conlleva a que estas alcancen su conformación estable mediante la asociación con más de un monómero (Kortt y col., 1997).

Este tipo de conformaciones en los fragmentos, también se obtienen mediante uniones covalentes al emplear hélices anfipáticas (Pack y Plückthun, 1992), dominios inmunoglobulínicos CH3 (Hu y col., 1996; Yazaki y col., 2001), cisteínas para formar puentes disulfuro (Fitzgerald y col., 1997), el factor de transcripción p53 humano, y mediante el uso de la estreptavidina (Willuda y col., 2001) que permiten la unión de las regiones variables pesadas y ligeras del anticuerpo.

En el caso específico del empleo de fragmentos de simple cadena en el diagnóstico o la terapia del cáncer, se plantea que pueden ser reactivos ideales debido a su mejor penetración tumoral, su rápido aclaramiento y su bajo fondo de marcaje, sobre todo cuando el propósito es la utilización en el radioinmudiagnóstico con el empleo de isótopos radioactivos (Raag y Whitlow 1995).

Sin embargo, en aplicaciones terapéuticas estos fragmentos resultan ser desventajosos, sobre todo por el rápido aclaramiento de la sangre, la relativa alta velocidad de disociación debido sobre todo a que el sitio de unión antigénico es simple, y la baja afinidad funcional (avidez). Es por esto, y con vista a contrarrestar tales inconvenientes, que se han generado numerosos fragmentos de anticuerpo como variantes multivalentes (Holliger y Hudson, 2005).

La multimerización de los fragmentos de anticuerpos puede ocurrir cuando las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras no pueden plegarse sobre sí y deben estabilizar su estructura apareándose a otra molécula para formar el sitio de unión al antígeno (Holliger y Hudson, 2005).

Los multímeros presentan una mayor avidez debido al aumento de su valencia, dado por la presencia de múltiples copias de los dominios de unión al antígeno. En el caso de que construcciones como estas se requieran para el radioinmudiagnóstico y la radioinmunoterapia es necesario tener en cuenta la avidez, la afinidad y la talla total de la proteína recombinante (Holliger y Hudson, 2005).

Estos tres aspectos son importantes a la hora de analizar la eficiencia del marcaje tumoral, pues una mayor avidez hace que el anticuerpo permanezca más tiempo unido al antígeno, una afinidad por encima de 10^9 M^{-1} puede afectar la penetración del anticuerpo al interior del tumor (Adams y col., 2001) y un mayor peso molecular puede aumentar el tiempo que permanece la molécula en sangre al ser incapaz de atravesar la barrera de filtración de los glomérulos renales (Kang y col., 2000; Sharkey y col., 2006).

El diseño óptimo del fragmento se determina experimentalmente al tener en cuenta un compromiso entre todos estos aspectos y en concordancia con la finalidad de la molécula diseñada.

2.7 Marcaje de fragmentos de anticuerpos con radioisótopos

Una de las múltiples aplicaciones de los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de anticuerpos es la conjugación con radioisótopos, drogas citotóxicas o toxinas para su empleo en la terapia o el diagnóstico del cáncer. Entre estas variantes la conjugación con radioisótopos es una de las más empleadas en las investigaciones referidas a la búsqueda de alternativas para el tratamiento y el diagnóstico de diversos tumores (Oriuchi y col., 2005).

Los isótopos radioactivos son elementos químicos a los cuales se les ha alterado el número de neutrones y protones que naturalmente posee. Mediante este proceder el núcleo del

elemento se vuelve inestable y requiere para alcanzar la estabilidad la emisión de una partícula alfa y/o beta (o positrón) que puede estar acompañada de la emisión de energía en forma de radiación electromagnética (rayos gamma) (Zimmermann, 2007).

El número de isótopos radioactivos que han sido creados hasta el momento asciende a 1800 (<http://www.uic.com.au/nip26.htm>). Sin embargo, no todos los isótopos disponibles pueden ser empleados en la medicina, para ello deben de presentar un corto tiempo de vida media, deben originar contraste de imágenes y deben de poseer un proceso de eliminación biológica (Zimmermann, 2007).

Para que un radioisótopo pueda usarse como un reactivo diagnóstico debe emitir rayos gamma con energía suficiente para que escape del cuerpo y pueda ser captado por el receptor o contador gamma dando lugar a una imagen, el tiempo de vida media del isótopo debe ser corto para que la señal decaiga una vez completada la imagen, pueden ser usados tanto en la oncología, como en la cardiología, reumatología o hematología (Zimmermann, 2007).

En el caso de la terapia el efecto ionizante de la radiación puede usarse para destruir células anormales o en rápido crecimiento, aunque su especificidad estará dada únicamente por las propiedades de la molécula a la que se encuentra unido. La excepción es el yodo, en forma de sales de yoduro, ya que este elemento puede acumularse espontáneamente en el tejido de las tiroides, sea o no canceroso (Zimmermann, 2007).

Las imágenes obtenidas de los radionúclidos gamma emisores unidos a los vectores es una fotografía exacta de la distribución de estas moléculas en el paciente. Si se reemplaza los isótopos gamma emisores de este vector por isótopos emisores beta o alfa no cambiará la distribución tisular de las moléculas marcadas y podrá transformarse el radiofármaco para imagen en uno terapéutico con un efecto localmente destructor (Zimmermann, 2007).

En la actualidad, además de la terapia con radiación gamma y beta se empieza a utilizar cada vez más la radiación alfa en un nuevo campo llamado terapia alfa dirigida (TAT: *targeted alpha therapy*) especialmente para el control de metástasis (Oriuchi y col., 2005).

La capacidad para que los anticuerpos marcados con radioisótopos puedan localizar tumores estará condicionada por múltiples parámetros, entre ellos: el tamaño del tumor, la estabilidad del radiofármaco, la forma de inyección, la presión del fluido intersticial, la vascularización y permeabilidad vascular del tumor, las uniones estrechas en los tumores bien diferenciados y el fenómeno de barrera del sitio de unión. Este último se produce principalmente con anticuerpos de alta afinidad dado que estos se unen establemente al primer antígeno tumoral encontrado y forman un parche que impide la perfusión del tumor por los anticuerpos (Goldenberg y col., 2006).

Las propiedades biofísicas de los anticuerpos también modulan la eficiencia de la localización tumoral, la masa molecular, la estabilidad térmica y la afinidad son algunas de las

propiedades de los anticuerpos que influyen en la localización del tumor (Goldenberg y col., 2006).

Al seleccionar el radionúcleo se debe tener en cuenta el tipo de emisión que presenta, su rango, la velocidad de la dosis tumoral requerida, la dosis tumoral total, el tiempo de vida media biológico, la eficacia del marcaje y la estabilidad. Para que el radiofármaco sea efectivo la unión con el anticuerpo debe ser estable *in vivo* y el procedimiento de marcaje no debe alterar las características de biodistribución y unión del anticuerpo (Clarke y col., 2000).

Dentro de los isótopos que más se han utilizado en la clínica se encuentra el Tecnecio-99, empleado en el 80% de los procedimientos para el diagnóstico en medicina nuclear. Este isótopo pertenece a los elementos de transición y presenta un tiempo de vida media de seis horas, apropiado para examinar algún proceso metabólico y suficientemente corto para minimizar la dosis de radiación en el paciente (Divgi, 1996).

El tecnecio decae por un proceso llamado isomérico el cual emite rayos gamma de 140 keV de energía sin emisión de partículas y electrones de baja energía. Los rayos gamma de baja energía que emite escapan fácilmente del cuerpo y son detectados por la cámara gamma (Zimmermann, 2007).

La unión de este elemento a un anticuerpo o sus fragmentos puede realizarse de manera directa o indirecta. El marcaje directo involucra la reducción de los enlaces disulfuro a sulfidrilo mientras que el indirecto se realiza mediante la unión del tecnecio-99m a un ligando (Thakur y col., 1991). El uso de los anticuerpos permite reducir la dosis de radiación que recibe el paciente durante el diagnóstico (Sharkey y col, 2006).

El renio es otro elemento de transición muy utilizado en la medicina nuclear, especialmente en la terapia por emitir radiaciones beta-menos. Sus isótopos más utilizados son el renio 188 y 186. Las radiaciones del renio 188 pueden penetrar hasta 11 mm en el tejido tumoral y matar algunos cientos de células (Sharkey y col., 2006).

Otro grupo de isótopos usados ampliamente en las investigaciones del cáncer y en la medicina nuclear son los isótopos de yodo. Dentro de estos los más empleados son el yodo-123, 125 y 131 (Zimmermann, 2007).

El ^{123}I presenta un tiempo de vida media de 13,2 horas, se caracteriza por emitir radiaciones gamma por lo que su uso está dirigido principalmente hacia el diagnóstico (Zimmermann, 2007).

El ^{125}I posee un tiempo de vida media de 59,9 días, se caracteriza por emitir fotones de baja energía (27 keV) y es usado fundamentalmente en la braquiterapia (radioterapia de rango corto) del cáncer, especialmente en implantes permanentes para la terapia del cáncer de próstata (Zimmermann, 2007).

El radioisótopo de ^{131}I es otro de los más empleados especialmente en el tratamiento del cáncer de tiroides que aprovecha la facilidad de esta glándula para la acumulación del yodo. Este es un potente emisor gamma (0,61 MeV de energía) con un tiempo de vida media de 8,02 días (Zimmermann, 2007).

El marcaje de proteínas con yodo radioactivo es un proceso sencillo, los métodos más usados para la unión de yodo radioactivo a inmunoglobulinas involucran la yodación de residuos de tirosina mediante un marcaje directo con el empleo de la cloramina T (McConahey y col., 1966; Stein y col., 2005) o el *Iodogen* (Colcher y col., 1993; Goel y col., 2001) además se puede emplear un marcaje indirecto en el cual se marca previamente un compuesto y luego este se une a la inmunoglobulina (Oyen y col., 2007).

Otros isótopos reportados por Zimmermann, 2007 como los más usados en la medicina nuclear son:

✗ Lutecio-177 ($t_{1/2}$ 6 a 7d): emite la energía gamma adecuada para visualizar la imagen y presenta emisión beta lo que permite a la vez la terapia de tumores pequeños.

✗ Paladio-103 ($t_{1/2}$ 17d): usado en la braquiterapia del cáncer de próstata en estadios tempranos.

✗ Samario-153 ($t_{1/2}$ 47h): beta emisor muy efectivo aliviando el dolor en tumores secundarios de hueso. También muy efectivo para el cáncer de próstata y mama.

✗ Estroncio-89($t_{1/2}$ 50d): muy efectivo para reducir el dolor en tumores de próstata, es un emisor beta.

✗ Itrio-90 ($t_{1/2}$ 64h): emite solo radiación beta, por lo que se utiliza en la braquiterapia del cáncer.

✗ Galio-67($t_{1/2}$ 78h): empleado en la visualización de tumores y la localización de lesiones inflamatorias.

✗ Indio-111($t_{1/2}$ 3d): no presenta emisión de partículas y se emplea en estudios de diagnóstico especializado, por ejemplo en estudios del cerebro.

2.8 Biodistribución y Farmacocinética de los fragmentos de anticuerpos

El término biodistribución incluye la distribución de una molécula por el organismo mediante el sistema circulatorio y significa la cantidad de esta molécula que es retenida en los diferentes órganos. Los parámetros más importantes a tener en cuenta en estos estudios serán el tiempo que la molécula permanece en sangre y en los órganos y la relación entre las cantidades de moléculas en sangre y las cantidades en los órganos.

Los principales factores que determinan la velocidad con que son eliminados los anticuerpos de la circulación sanguínea son su tamaño y la presencia del dominio Fc, ambos

factores determinan cuándo la molécula se eliminará por filtración renal o por el sistema mononuclear fagocítico (Sancho y col., 1984 y Yokota y col., 1993).

Al igual que otros compuestos, los radiofármacos con pesos moleculares grandes (PM mayor de 80 kDa) son eliminados principalmente mediante fagocitosis (Yokota y col., 1993).

Sin embargo, los radiofármacos conformados por fragmentos de anticuerpos sin la porción Fc, cuyo tamaño molecular no supera los 80 kDa por lo general son eliminados mediante filtración renal (Holliger y col., 1997).

La eliminación por fagocitosis es un proceso más lento, que requiere energía comparado con la filtración que es un proceso pasivo dependiente sólo de las altas presiones sanguíneas en el riñón, aunque la selectividad de carga de la membrana basal glomerular del riñón puede explicar la heterogeneidad en el nivel de acumulación renal observado entre diferentes fragmentos de anticuerpo (Kang y col., 2000).

El marcaje tumoral está influenciada a su vez por factores tales como el tipo de radioisótopo (Mattes y col., 1994), el tamaño del tumor (Mann y col., 1984 y Hagan col., 1986), la dosis del radiofármaco administrado (Adams y col., 1995 y Narula y col., 1997) y la presencia de antígeno tumoral en sangre (Behr y col., 1996).

La extrapolación directa de los resultados obtenidos en los experimentos de biodistribución y farmacocinética desde los ratones hacia los humanos no es correcta, ya que está demostrado que los anticuerpos y los fragmentos radiomarcados generalmente muestran un aclaramiento más lento en el humano que lo observado en este modelo animal (Lin, 1995).

Para obtener el éxito en la radioinmunoterapia es necesario lograr una absorción óptima por parte del tumor de las dosis administradas, lo cual sólo es posible asegurando una entrega sistémica de elevada actividad específica. Esto significa que la radiotoxicidad incidental en la médula ósea y en los órganos involucrados en el catabolismo y la eliminación de los radiofármacos, tales como el hígado y el riñón puede ser elevada. Sin embargo, las cantidades de radiaciones que el paciente recibe por este método siempre será muy inferior a las recibidas por el método de la radioterapia convencional (Sharkey y col., 2006).

Los tumores sólidos presentan varias características que pueden disminuir el éxito de la radioinmunoterapia con anticuerpos (Jain, 1990) como son:

- Poca radiosensibilidad
- Expresión heterogénea del antígeno
- Vasculatura tumoral relativamente pobre
- Elevada presión intersticial
- Necrosis tumoral

Por tal motivo es de suma importancia hacer una selección adecuada tanto del isótopo radioactivo como del antígeno blanco a donde va estar dirigido el anticuerpo o el fragmento (Jain, 1990).

2.9 Ensayos Clínicos en Cáncer con Anticuerpos y Fragmentos

El avance de las investigaciones médicas sobre el cáncer en los últimos años han permitido incrementar los niveles de sobrevivencia y calidad de vida de los pacientes para prácticamente todos los tipos de cáncer, pero sin dudas los mayores logros han sido obtenidos en el tratamiento de las leucemias, el cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer colorectal (Gralow y col., 2007).

Los resultados tan alentadores que se han obtenido en los ensayos clínicos con anticuerpos y sus fragmentos contra moléculas asociadas a la fisiología, sobrevida y crecimiento de los tumores han reforzado el interés por la inmunoterapia en el tratamiento contra esta enfermedad (Oyen y col., 2007).

Existen en la actualidad 104 anticuerpos o fragmentos en diferentes niveles de ensayo clínico para cáncer. Nueve de los 21 anticuerpos terapéuticos disponibles hoy en el mercado son para la terapia del cáncer (Carter, 2006), 4 de ellos: Herceptin®, Erbitux®, Vectibix® y Avastin® contra los tumores sólidos (Reichert y col., 2005; Carter, 2006; <http://biotech.seekingalpha.com/article/40162>).

Dentro de los mayores avances en las investigaciones clínicas sobre el cáncer de los últimos años se encuentran los resultados obtenidos con los siguientes anticuerpos:

- Trastuzumab (Herceptin; Genentech Inc.), anticuerpo que reconoce y bloquea a la proteína HER-2 expresada en cáncer de mama. Ha quedado demostrado, en dos ensayos clínicos, que el empleo de este anticuerpo monoclonal conjuntamente con la quimioterapia en mujeres con cáncer de mama en estadios tempranos que expresan la proteína HER-2, reduce el riesgo de recurrencia en el 52% de los casos y disminuye el riesgo de muerte después de tres años en un 33%, comparado con el tratamiento tradicional de quimioterapia. Investigaciones recientes demuestran que después de un año de tratamiento con este anticuerpo, el riesgo de recurrencia del tumor ha sido reducido en un 46% (Herbst y col., 2006).
- Bevacizumab (Avastin; Genentech Inc.), anticuerpo específico contra el factor de crecimiento endotelial de los vasos sanguíneos (VEGF). Estudios en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de colon avanzado, han demostrado un aumento significativo de la sobrevida al usar este anticuerpo en conjunto con la quimioterapia. En la actualidad hay más de 100 ensayos clínicos con este anticuerpo aprobados por la FDA (Herbst y col., 2006).

- Rituximab (Rituxan; Genentech Inc.), anticuerpo que reconoce a la proteína CD20 expresada en los linfocitos B. Se ha demostrado que el uso de este anticuerpo en conjunto con la quimioterapia puede prolongar significativamente la remisión del tumor e incrementar la supervivencia en pacientes con linfomas agresivos y difusos (Herbst y col., 2006).

- Tositumomab (Bexxar; GlaxoSmithKline), anticuerpo desarrollado contra la proteína CD20 de los linfocitos B. Estudios han demostrado que este anticuerpo unido al isótopo radioactivo ¹³¹I, provoca un aumento significativo de la remisión de los linfomas foliculares (Herbst y col., 2006).

- Cetuximab (Erbix; ImClone Systems Inc.), anticuerpo contra el receptor de EGF. Estudios en pacientes con cáncer de cabeza y cuello muestran que el uso de este anticuerpo conjuntamente con el tratamiento normal de quimioterapia aumenta la vida de los pacientes y en algunos casos se demostró que pudieran preservar la laringe (Herbst y col., 2006).

Entre los fragmentos de anticuerpos aprobados en los últimos años por la FDA se encuentran el Ranibizumab (Lucentis), un fragmento Fab del anticuerpo Bevacizumab (Avastin) usado para combatir la degeneración macular asociada a la edad (Pieramici y Avery, 2006) y el Arcitumomab (CEAscan), un fragmento Fab obtenido por digestión enzimática, marcado con ^{99m}Tc que ha proporcionado muy buenos resultados en el diagnóstico del cáncer colorectal y en la detección del cáncer de tiroides medular (Kelloff y col., 2005).

Existen además varios fragmentos de anticuerpos recombinantes que se encuentran en diferentes niveles de estudios clínicos; entre los que se encuentran: el fragmento dimérico del anticuerpo quimérico anti-CEA T84.66 conjugado con ¹²³I estudiado en pacientes con cáncer colorectal (Wong y col., 2004), un fragmento de simple cadena anti-CEA llamado MFE-23 obtenido de una biblioteca de fagos que conjugado con ¹²⁵I demostró un nivel de captación tumoral del 100 % de los tumores en pacientes con cáncer de colon sometidos a cirugía (Mayer, 2000), un fragmento de simple cadena del anticuerpo anti-ErbB2 (Erbicin) que fusionado a las regiones CH2 y CH3 de la IgG humana y en combinación con el anticuerpo Herceptin ha demostrado un potente efecto antitumoral en células de cáncer de mama (De Lorenzo y col., 2007). También se encuentra en evaluación un fragmento F(ab')₂ del anticuerpo M1-14, obtenido por vía enzimática, que está siendo usado en la radioinmunoterapia de pacientes con metástasis cerebral y pacientes con metástasis o cáncer primario de melanoma (De Lorenzo y col., 2007).

Como puede observarse tanto los anticuerpos como los fragmentos cada vez ganan más importancia y significación dentro del campo médico expandiéndose su papel en la terapia del cáncer, debido sobre todo a que generalmente al compararse con otros medicamentos, los tratamientos con anticuerpos son bien tolerados por los pacientes y tienen pocos efectos indeseados, es por ello que la inmunoterapia con anticuerpos combinadas con los tratamientos

estándar disponibles, constituye la estrategia mas prometedora para ganar la larga batalla contra esta enfermedad (Gralow, 2008).

3. Materiales y Métodos

3.1 Microorganismos.

- Cepa de *Escherichia coli*, RV308: (*lac74-galSI:OP308-str A*) (Maurer y col., 1980).
- Cepa de *Escherichia coli*, XL-1 blue: (*F':::Tn10 proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15/recA1endA1 gyrA96(Nal^r) thi hsdR17(r_k⁻m_k⁺)supE44 relA1 lac*) (Bullock y col., 1987).

3.2 Línea celular de organismos superiores.

- LS 174T (ATCC CL-188): Originadas de adenocarcinoma colorectal humano, expresan CEA (antígeno carcinoembrionario). Son cultivadas en RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino.

3.3 Reactivos, soluciones, sueros y medios de cultivo.

Se emplearon reactivos de las firmas Oxoid y BDH (Reino Unido), Merck (Alemania), Boehringer-Mannheim (Alemania), Sigma-Aldrich (EUA), FMC Bioproducts (EUA), Fluka (Suiza) y Probus (España). Enzimas de modificación y restricción: Promega (EUA), New England BioLabs (EUA).

- Tampón de Lisis: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, 1 mg/mL de lisozima, pH 7.5.
- Tampón de Extracción: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7.8.
- Tampón de Equilibrio: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7.8, Imidazol 5 mmol/L.
- Tampón de Lavado 1: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7.8, Imidazol 25 mmol/L.
- Tampón de Lavado 2: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7.8, Imidazol 50 mmol/L.
- Tampón de Elución: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300mmol/L, pH 7.8, Imidazol 250 mmol/L.
- Tampón para la Gel filtración: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7.8.
- Tampón para la conservación: NaH₂PO₄ 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L, pH 7.8, EDTA 5 mmol/L.
- Tampón de Muestra 2X: Tris-HCl 125 mmol/L, pH 6.8, 2-mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 6% (m/v), bromofenol azul 0,05% (m/v) y glicerol 20% (v/v).
- Solución de Corrida 1X: Tris 25mmol/L, glicina 250mmol/L y SDS 0,2% (m/v).
- Solución de Tinción: Azul de Comasie 2,5 g/L, ácido acético 90 mL/L, metanol 430 mL/L.
- Solución de Destinción: Metanol 50 mL/L, ácido acético 75 mL/L.
- Solución sustrato para *Western blotting*: 7,5 mg/mL de diamino bencidina (DAB, Sigma, EUA), 10 µL de peróxido de hidrógeno 0,03% (v/v) disueltos en PBS 1X.

- Solución sustrato para ELISA: 5 mg de *orthophenilendiamine* (OPD, Sigma, EUA), 10 mL de tampón sustrato y 10 μ L de peróxido de hidrógeno.
- Solución de parada: ácido sulfúrico 2,5 N.
- Solución de Rojo Ponceau S: Ponceau S 20 g/L, ácido tricloroacético 300 g/L y ácido sulfosalicílico 300 g/L.
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X): NaCl 137 mmol/L, KCl 2,6 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L y KH₂PO₄ 1,7 mmol/L, pH 7.4 ajustado con HCl.
- Suero policlonal anti fragmento Fab del anticuerpo CB/iorCEA.1: Generado en conejos mediante tres inmunizaciones con 50 μ g de anticuerpo CB/iorCEA.1 en adyuvante completo e incompleto de Freund.
- Suero policlonal anti-fragmento anti-CEA M3: Generado mediante inmunización de conejos con 100 μ g de fragmento anti-CEA en adyuvante completo e incompleto de Freund y posteriormente purificados en cromatografía de afinidad a proteína A.
- Anticuerpo monoclonal 9E10 conjugado con peroxidasa que reconoce al epitope c-myc.
- Anticuerpo monoclonal anti-CEA CB/iorCEA.1.
- Anticuerpo monoclonal anti-rechazo al trasplante ior-T1.
- Fragmento de anticuerpo de simple cadena F3.
- Medio líquido de cultivo Luria Bertani (LB): 8 g/L de triptona (Oxoid, Reino Unido), 5 g/L de extracto de levadura (Oxoid, Reino Unido), 2,5 g/L de NaCl (Merck, Alemania), pH 7.0-7.5.
- Medio sólido de cultivo Luria Bertani (LB): medio líquido LB con 1,5% (m/v) de agar bacteriológico (Oxoid, Reino Unido).
- Medio líquido de cultivo 2xYT: 16 g/L de triptona (Oxoid, Reino Unido), 10 g/L de extracto de levadura (Oxoid, Reino Unido), 5 g/L de NaCl (Merck, Alemania), pH 7.0-7.5.
- Medio sólido 2xYT: medio líquido 2xYT con 1,5% (m/v) de agar bacteriológico (Oxoid, Reino Unido).
- Medio líquido de cultivo YTBS: 16 g/L de triptona (Oxoid, Reino Unido), 10 g/L de extracto de levadura (Oxoid, Reino Unido), 5 g/L de NaCl (Merck, Alemania), 182,2 g/L de D-sorbitol (Merck, Alemania) y 0,338 g/L de betaína (Sigma-Aldrich, EUA).
- Medio Completo RPMI 1640 (GIBCO, EUA), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Hyclone, EUA) y 50 μ g/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA).

Las técnicas de uso habitual que utilizan los laboratorios de ingeniería genética se realizaron según los procedimientos que se describen en el Manual de Laboratorio de clonaje molecular (Sambrook y col., 1989). Las particularidades introducidas en el desarrollo de cada una de las técnicas se describen en cada caso.

3.4 Clonación y Secuenciación de los genes que codifican para las regiones variables del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1.

El ARN total se aisló a partir de 10^6 células del hibridoma secretor del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1, para lo cual se usó el reactivo *TriPure™ Isolation Reagent* (Boehringer-Mannheim, Alemania). El ADN complementario se sintetizó con el juego de reactivos para RT-PCR (Boehringer-Mannheim, Alemania), y se usó un oligo dT como cebador.

A partir de este ADN se amplificó el gen de cada región variable mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el uso de oligonucleótidos diseñados en base a las secuencias consensos del péptido señal y la región constante de inmunoglobulinas de ratón (CH1 y Ck) reportadas por Kabat y col., 1991 (Tabla 1).

Tabla 1: Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos sintéticos usados para la amplificación de los genes de cadena variable pesada (**V_H**) y ligera (**V_L**) y la construcción del fragmento de anticuerpo. Algunos oligonucleótidos al ser degenerados pueden presentar en su secuencia las letras R, K, Y y W, lo cual significa que durante la síntesis en ese lugar puede ser incorporada una de las dos bases nitrogenadas que representan. La letra R significa la síntesis de A ó G, K significa la síntesis de G ó T, Y significa la síntesis de C ó T y W significa la síntesis de A ó T.

Oligonucleótido	Secuencia
#1. Péptido Señal de V _H	5'..GGGGATATCCACCATG R ACTTCGGGY T GAGCTKGGTTT..3'
#2. Región CH1	5'..AYCTCCACACACAGG R CCAGTGGATAGAC..3'
#3. Péptido Señal de V _L	5'..GGGGATATCCACCATGGAG W CACA K WCTCAGGTCTTT R TA..3'
#4. Región constante Ck	5'..ACTGGATGGTGGGAAGATGGA..3'
#5. Nco I- FR1 V _H	5'..TCTCACACCATGGAGGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGG..3
#6. Not I- FR4 V _L	5'..AAGGAAAAAGCGGCCGCTTTCAGCTCCAGCTTGGTT..3
#7. 5-aa linker/FR4 V _H	5'..AGAGCCGCCGCCACCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT...3
#8. 5-aa linker/FR1 V _L	5'..GGTGGCGGCCGCTCTGACATTGTGATGACCCAGTCT..3'

FR: Regiones marcos que delimitan los determinantes de la complementariedad del anticuerpo.

CH: Región constante de la cadena pesada del anticuerpo.

Ck: Región constante de la cadena ligera del anticuerpo.

Los oligonucleótidos se usaron a una concentración final de 1 μ mol/L en un volumen de reacción de 100 μ L. Las condiciones para el PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 94°C, 1 minuto, acoplamiento a 55°C, 1 minuto, extensión a 72°C, 1 minuto, durante 25 ciclos, el último ciclo fue de 5 minutos de extensión. El PCR se realizó en un termociclador modelo PTC 150 de MJ Research (EUA). Las tallas de las bandas amplificadas se estimaron en una electroforesis de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, EUA). Se usó como referencia el patrón de peso molecular 1kb DNA *ladder* (Promega, EUA).

Los genes amplificados de cada región variable, provenientes cada uno de 3 PCRs diferentes, se insertaron por separado en el vector intermedio pMOS-Blue (Amersham Pharmacia Biotech). Este vector se transformó posteriormente en la cepa competente de bacteria XL-1 blue para su selección y reproducción.

Cinco colonias de cada transformación se seleccionaron y se crecieron en 100 mL de medio de cultivo líquido LBA durante 16 horas a 37°C. El ADN plasmídico se purificó con el empleo del juego de reactivos midi prep (QIAGEN, Alemania) y se realizaron las secuencias nucleotídicas de cada región variable del anticuerpo CB/iorCEA.1, mediante el secuenciador

automático ALF Express II (Farmacia, Suecia), y el juego de reactivos para secuencia *Thermus Sequenase 5 Cy Dye terminador* (Amershan, EUA).

3.5 Ensamblaje mediante la reacción en cadena de la polimerasa del gen que codifica para el Fragmento de anticuerpo anti-CEA.

Los genes del fragmento de anticuerpo anti-CEA se ensamblaron en el formato V_H-L-V_L mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que se usaron para ello se diseñaron teniendo en cuenta las secuencias V_H y V_L consensos ya obtenidas e incorporandoles los sitios de restricción *Nco* I y *Not* I necesarios para la clonación (oligonucleótidos #5 y #6, Tabla 1). En los oligonucleótidos también se incluyeron las bases adicionales que dieron lugar al gen del fragmento de unión entre las dos regiones variables (5 aminoácidos: GGGGS; oligonucleótidos #7 y #8, Tabla 1). Como ADN molde se usaron los plasmidios que contenían los genes de los dominios V_H y V_L del anticuerpo cuyas secuencias habían sido previamente verificadas.

Se realizaron PCRs independientes sobre V_H y V_L con el empleo de los oligonucleótidos #5 y #7, y oligonucleótidos #8 y #6, respectivamente. Para obtener el ensamblaje final del gen del fragmento se realizó un nuevo PCR sobrelapado donde se mezclaron 4 µL de las reacciones anteriores con los oligonucleótidos #5 y #6 a una concentración final de 1 µmol/L, y los oligonucleótidos #7 y #8 a una concentración final de 0,01 µmol/L. Las condiciones del PCR fueron las mismas que se describieron anteriormente en el acápite 3.4. La talla final del gen amplificado se confirmó mediante el patrón de peso molecular 1kb DNA *ladder* (Promega, EUA) aplicados en una electroforesis en agarosa al 1% con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, EUA).

3.6 Inserción del gen que codifica para el fragmento anti-CEA en el vector de expresión pAcR.1.

El gen obtenido en el acápite anterior se clonó en el vector de expresión pAcR.1 que cuenta como elementos principales con un promotor Lac, el péptido señal pelB (*Peptate lyases B*), los sitios de clonaje *Nco* I y *Not* I, un dominio que codifica para un péptido c-myc usado como blanco para la identificación de la proteína durante la expresión, un péptido de 6 histidinas para la purificación por afinidad a queratos y el terminador de la transcripción del fago lamda (T4) (Figura 6).

Para la inserción del gen, tanto el ADN del fragmento como el vector pAcR.1 se digirieron con las enzimas de restricción *Nco* I y *Not* I (Promega, EUA) y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, ambos ADN se empalmaron con el empleo de la enzima ADN T4 ligasa (Promega, EUA) y se incubaron durante 18 horas a 16°C.

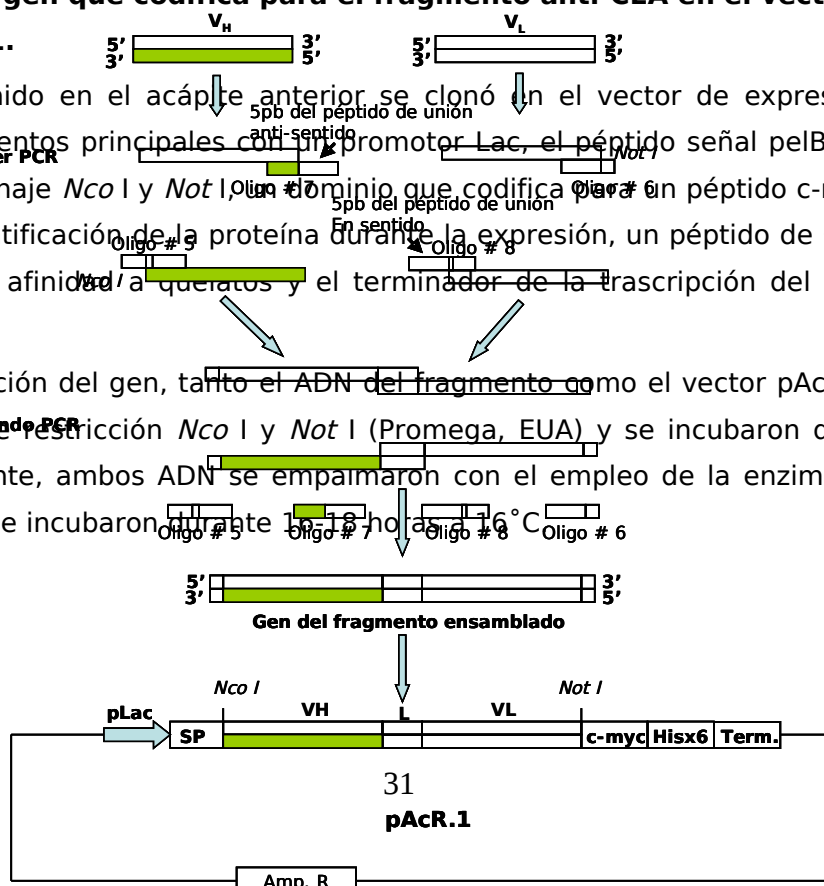


Figura 6: Diagrama del ensamblaje y la clonación de los genes del fragmento anti-CEA en el vector pAcR.1. **pLac:** Promotor del operón lactosa, **SP:** Péptido señal para la expresión de la proteína al periplasma bacterial, **c-myc:** Péptido c-myc, **His:** 6 residuos consecutivos de histidina, **Term:** Región terminadora, **Nco I y Not I:** Endonucleasas de restricción (se señalan los sitios de corte de estas enzimas); **VH:** Región variable de la cadena pesada, **L:** Péptido de unión (*Linker*), **VL:** Región variable de la cadena ligera, Amp. R: Gen de resistencia a la ampicilina.

El producto de esta reacción se transformó en la cepa de *E. coli* XL-1 Blue mediante electroporación, la cepa transformada se extendió en medio LB sólido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó durante 16 horas a 37°C.

La selección de los clones positivos se realizó mediante PCR sobre las colonias obtenidas de la transformación anterior y el empleo de los oligonucleótidos #5 y #6 (Tabla 1); se usó igual programa que en la sección 3.4.

La confirmación del clonaje se realizó al crecer 15 colonias en 5 mL de medio LB líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina durante 16 horas a 37°C. Los plasmidios se purificaron mediante el juego de reactivos Mini Prep (QIAGEN, Alemania) y 4 µg de ADN se digirieron con las enzimas de restricción *Nco* I y *Not* I a 37°C durante 1 hora. Las tallas moleculares del ADN se estimaron en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, EUA) y se compararon con las bandas del patrón de peso molecular para ADN 1kb DNA *ladder* (Promega, EUA).

3.7 Selección de los clones que expresan el fragmento anti-CEA.

3.7.1 Transformación e inducción de la expresión en *Escherichia coli*.

Se transformaron células competentes de la cepa de *E. coli* RV308 con el ADN plasmídico de uno de los clones positivos seleccionados previamente y con el vector sin el gen de interés (Control negativo). Las células transformadas se extendieron en una placa Petri recubierta con medio sólido selectivo 2xYT suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 2% (v/v) de glucosa, e incubadas a 37°C durante 16 horas. De las colonias crecidas en la placa con la transformación que porta el gen del fragmento, se seleccionaron aleatoriamente 11 colonias y se inocularon en 10 mL de medio líquido 2xYT suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 2% (v/v) de glucosa, incubándose durante 17 horas en zaranda a 37°C y 250 rpm. Del control negativo se sembró una colonia y se procedió de igual forma.

De los cultivos anteriores se tomaron 2,5 mL y se inocularon 50 mL de medio líquido 2xYT fresco suplementado con 100 µg/mL de ampicilina más 2% (v/v) de glucosa (dilución 1:20) incubándose a 37°C y 250 rpm durante aproximadamente 4 horas (hasta alcanzar DO_{630nm} entre 0,8 y 1,0).

Los cultivos se centrifugaron a 3 000 g durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 50 mL de medio 2xYT fresco suplementado con ampicilina e IPTG a 1mmol/L, se incubó en zaranda durante 17 horas a 28°C y 250 rpm. Al finalizar la incubación se tomó un volumen de muestra en mL equivalente a $2/DO_{630nm}$ del cultivo, se centrifugaron las células a 10 000 g durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.

3.7.2 Identificación de la expresión del fragmento anti-CEA en la biomasa total mediante electroforesis de poliacrilamida y *Western blotting*.

Para comprobar la expresión del fragmento anti-CEA en la biomasa total de la bacteria se realizó una electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS/PAGE) al 15% (v/v).

El precipitado celular resultante de la centrifugación del volumen estimado mediante el cálculo de $2/DO_{630nm}$ (acápito 3.7.1), se resuspendió en 50 µL de agua destilada y 50 µL de tampón de muestra 2X y se calentó a 95°C durante 5 minutos, 10 µL de estas muestras se aplicaron en dos geles de poliacrilamida colocados en una cámara de electroforesis vertical (Sigma, EUA). Como control positivo de la expresión y la talla molecular se usaron 10 µg de un fragmento de anticuerpo de simple cadena denominado F3 que también presenta el péptido etiqueta c-myc, como control negativo se utilizó la cepa de bacteria transformada con el vector sin el gen de interés. Los parámetros para la electroforesis fueron las siguientes: 25 mA y 200 V; tampón de corrida 1X.

Al finalizar la corrida uno de los geles se coloreó con solución de tinción y se decoloró con solución de destinción según la descripción de Sambrook y col., 1989. Para estimar el porcentaje

de expresión de la proteína, los geles se procesaron mediante densitometría digital con el uso de un scanner hp scanjet 5470c (Hewlett Packard, EUA) conectado a una computadora. Para el procesamiento de la imagen se utilizó el programa *Molecular Analysis* ver. 2 de BioRad, estimándose el porcentaje que representaba cada banda de proteína presente en el gel del total de proteínas aplicado.

La inmunoidentificación de la proteína expresada se llevó a cabo mediante *Western blotting* con la aplicación de la metodología descrita por Towbin y col., 1979 y el empleo de el anticuerpo monoclonal 9E10 que reconoce el péptido etiqueta c-myc colocado en el extremo carboxilo terminal del gen. La transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa se realizó según las recomendaciones de Gavilondo y col., 1993 y el uso del *Trans-blot SD Semi-dry Transfer Cell* (Bio-Rad, EUA).

Terminada la transferencia, la membrana se reveló con una solución de Rojo Ponceau S durante 1 minuto, y seguidamente se lavó con agua desionizada con el fin de comprobar la transferencia de las proteínas hacia la misma, luego se decoloró con una solución de PBS 1X y se continuó con los procedimientos para el *Western blotting*.

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche descremada al 2% (m/v) en PBS 1X durante 1 hora a 37°C y se lavó tres veces con PBS 1X, con una duración de 2 a 3 minutos cada lavado. La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal de ratón (AcM) anti-c-myc (9E10) (Munro y Pelham, 1986), diluido en PBS 1X-leche descremada 0,5% (m/v) a una concentración de 10 µg/mL durante 1 hora a 23°C con agitación en un balancín. Se repitieron los lavados con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo de carnero anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma, EUA) diluido 1:5 000 en PBS 1X con leche descremada 0,5% (m/v) durante 1 hora a 23°C con agitación en un balancín. Los lavados se repitieron de 5 a 6 veces. La reacción de revelado se llevó a cabo con la adición a la membrana de nitrocelulosa de 10 mL de solución sustrato para *Western blotting*; y se esperó como máximo 5 minutos para el desarrollo de color. La reacción se detuvo por decantación y lavado con agua destilada. Como control positivo del experimento se utilizó un fragmento de anticuerpo que contiene el péptido c-myc y un peso molecular de entre 27 y 30 kDa. Se seleccionaron como positivos los clones inmunoidentificados a la talla correcta y se realizaron glicerol de cada uno de ellos almacenandolos a -70°C.

3.8 Determinación del fragmento anti-CEA en la fracción soluble de la ruptura celular.

3.8.1 Extracción del fragmento anti-CEA mediante ruptura celular por ultrasonido.

Uno de los clones positivo seleccionados anteriormente se utilizó para realizar una nueva inducción de la expresión, empleandose en este caso 1 L de medio de cultivo. Se partió con la siembra de 50 mL de medio 2xYT, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina más 2% (v/v) de glucosa, con 20 µL de un glicerol almacenado a -70°C. El cultivo se incubó durante 17 horas en zaranda a 37°C y 250 rpm.

Posteriormente, todo el cultivo anterior se adicionó a 950 mL de medio líquido 2xYT fresco suplementado con 100 µg/mL de ampicilina más 2% (v/v) de glucosa (dilución 1:20) y se incubó a 37°C y 250 rpm durante aproximadamente 4 horas (hasta alcanzar DO_{630nm} entre 0,8 y 1,0).

Trascurrido este tiempo, el cultivo se centrifugó a 3 000 g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 1000 mL de medio YTBS fresco suplementado con ampicilina e IPTG a 1mmol/L; y se incubó en zaranda durante 18 horas a 28°C y 250 rpm.

La biomasa obtenida después de centrifugar el cultivo anterior y eliminar el sobrenadante se resuspendió en 20 mL de tampón de lisis en una proporción de 1:50 (1 mL de tampón de lisis por cada 50 mL de cultivo). La suspensión celular se incubó en hielo durante 30 minutos y luego se sometió a tres ciclos de ultrasonido (1 minuto de ultrasonido con 70% de amplitud, 1 minuto en hielo) con el empleo de un equipo U200S control (IKA, Alemania); al final se colocó nuevamente en hielo durante 1 hora con agitación. Se tomaron 50 µL de la ruptura total para el análisis de expresión del fragmento mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% y el resto se centrifugó a 10 000 g, 4°C, durante 60 minutos, para separar la fracción soluble de la insoluble. La fracción soluble se colectó en un frasco limpio e inmediatamente se colocó a 4°C; de esta fracción se extrajeron 50 µL para la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante al 15 %.

3.8.2 Purificación por IMAC del fragmento anti-CEA presente en la fracción soluble.

La purificación del fragmento anti-CEA presente en el sobrenadante de ruptura se realizó mediante una cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC), teniendo en cuenta la presencia en la proteína de un péptido de 6 histidinas. Se utilizaron concentraciones crecientes de imidazol en los pasos de unión, lavado y elución.

Para ello se empaquetó una columna XK-10/10 (Amersham-Pharmacia, EUA) con 2 mL de matriz His-Select HC *Nickel Affinity Gel* (Sigma, EUA). Antes de realizar la cromatografía los 20 mL con la fracción que contiene el fragmento soluble se filtró por una membrana con 0,45 µm de poro y se le adicionó imidazol hasta una concentración de 5 mmol/L.

Inicialmente, la columna se lavó dos veces con un volumen de agua bidestilada equivalente al volumen del gel, posteriormente se equilibró con tampón de equilibrio a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto, equivalente a una velocidad líneal de 6 cm/h. La fracción soluble de la ruptura celular se aplicó a la columna con igual flujo y se colectaron las proteínas no unidas a la matriz. Aquellas proteínas unidas débilmente se removieron mediante un lavado extensivo con tampón de lavado 1.

Las proteínas unidas fuertemente a la matriz se eluyeron con tampón de elución, manteniéndose la misma velocidad de flujo de 1 mL/minuto.

Los resultados de todo el proceso se registraron en un cromatograma y las muestras obtenidas en cada uno de los pasos se colocaron a 4°C hasta su análisis.

Para la determinación de la concentración de proteínas presentes en el sobrenadante de ruptura, las proteínas no unidas a la matriz y las proteínas del lavado se utilizó el método descrito por Whitaker y Granum en 1980 quienes realizaron lecturas de absorbancia a 235 y 280 nm y dividieron estos valores por el factor 2,51 que corresponde a la diferencia entre los promedios de los coeficientes de extinción. La concentración se determinó mediante la ecuación:

$$\text{Conc}(\text{mg} / \text{mL}) = \frac{A_{235\text{nm}} - A_{280\text{nm}}}{2,51} \times \text{Dilución}$$

Cuando la muestra estuvo constituida por los fragmentos de anticuerpo purificados (proteínas de la elución) se empleó la ecuación:

$$\text{Conc}(\text{mg} / \text{mL}) = \frac{DO_{280\text{nm}}}{1,55} \times \text{Dilución}$$

Donde 1,55 es el valor teórico del coeficiente de extinción del fragmento de anticuerpo.

En ambos casos las muestras se diluyeron en la misma solución tampón en que se encontraban.

3.8.3 Análisis de la pureza y inmunoidentificación del fragmento anti-CEA.

La pureza del fragmento anti-CEA se analizó en una electroforesis desnaturizante con geles de poliacrilamida al 15% y densitometría. Se aplicaron en el gel 10 µg de proteínas totales, según los estimados de concentración calculados mediante la fórmula descrita en el acápite 3.8.2.

El *Western blotting* para la inmunoidentificación del fragmento se realizó con el AcM 9E10 anti c-myc y el mismo procedimiento que se describe en el acápite 3.7.2. Se analizaron las muestras obtenidas durante cada paso de la purificación.

3.9 Purificación del fragmento anti-CEA M3 mediante Cromatografía de Exclusión Molecular.

Los análisis por densitometría dieron como resultado que la proteína eluida del IMAC tiene más del 90% de pureza. Sin embargo, con el objetivo de separar las posibles conformaciones moleculares del fragmento, que según la literatura pueden formarse durante la expresión y eluir de conjunto en la purificación, e incluso no ser separados mediante electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida, se decidió realizar una cromatografía de exclusión molecular en HPLC como segundo paso de purificación.

Se empleó para ello una columna XK-10/30 (Amersham-Pharmacia, EUA) analítica con la matriz Superdex 200 (Amersham-Pharmacia, EUA) que permite la separación de fracciones entre 10 kDa y 600 kDa.

La columna se equilibró con el tampón para gel filtración a una velocidad de flujo lineal de 6 cm/h. Previamente se realizó la calibración de la misma, para lo cual se empleó un patrón de peso molecular que contiene: ribonucleasa A (13,7 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa),

ovalbúmina (43 kDa), albúmina (67 kDa) (Pharmacia, EUA). Luego se aplicaron entre 150 y 200 μ L de las proteínas eluídas durante la purificación por IMAC a una concentración de 0,5 mg/mL y se colectaron cada una de las fracciones eluídas.

Las fracciones obtenidas en esta cromatografía se concentraron aproximadamente 10 veces su volumen mediante un concentrador (Amicon, EUA) con el uso de una membrana de 10 kDa de límite de exclusión. La concentración de proteína se calculó mediante la fórmula descrita en el acápite 3.8.2 para el fragmento puro. Se definió el pico 1 como la fracción de mayor interés (denominado en lo adelante fragmento anti-CEA M3).

Al concluir la purificación del fragmento se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y una inmunoidentificación por *Westen blotting* de los picos 1 y 2 donde se usó el AcM 9E10 anti-cmyc. Se aplicó para estas muestras el procedimiento descrito anteriormente en el acápite 3.7.2.

3.10 Efecto del pH y la concentración de NaCl en la proporción entre los picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA.

Teniendo en cuenta que la conformación dimérica del fragmento anti-CEA se alcanza mediante uniones no covalentes, durante la cual las interacciones iónicas y los puentes de hidrógeno jugaran un papel muy importante y además, con los antecedentes encontrados en la literatura donde demuestran que las proporciones entre las fracciones monoméricas y diméricas de un fragmento de simple cadena pueden cambiar con la variación de estos parámetros (Arnd y col., 1998). Nos propusimos estudiar el efecto que ejerce el pH y la concentración de sales sobre el equilibrio entre los picos 1 y 2 que eluyen de la cromatografía de exclusión molecular, con el fin de incrementar el recobrado de la fracción de interés (pico 1).

Para ello, la misma biomasa procedente de una fermentación de bacteria en 5 L (100 gramos de biomasa húmeda) se subdividió en varias fracciones de 5 gramos, a cada una de estas fracciones se les realizó la extracción y purificación del fragmento anti-CEA siguiendo los procedimientos descritos en los acápites 3.8 y 3.9 pero con el empleo durante la ruptura de la prensa de French. Para la purificación por IMAC y la cromatografía en gel filtración se emplearon tampones con las concentraciones de NaCl de 300, 150 y 100 mmol/L, a cada uno de los tampones se les ajustó el pH a 7.0, 7.5 y 8.0 respectivamente. El tiempo de retención de cada uno de los picos eluidos, los porcentajes correspondientes a cada uno y la proporción entre ellos, se estimaron a partir de los cromatogramas obtenidos al aplicar 250 μ L de cada elución de IMAC en una columna XK-10/30 (Amersham-Pharmacia, EUA) analítica con la matriz Superdex 200 (Amersham-Pharmacia, EUA). El flujo durante la corrida se mantuvo en 0,4 mL/minuto (equivalente a un flujo lineal de 2,5 cm/h).

3.11 Reconocimiento específico del fragmento anti-CEA M3 al antígeno humano, mediante un ensayo ELISA.

Con el objetivo de estudiar la especificidad del pico 1 (fragmento anti-CEA M3), se realizó un ELISA de reconocimiento al antígeno CEA humano, con el uso de la BSA como proteína no relacionada.

Para ello, una placa ELISA de polivinilo de 96 pozos se dividió en dos partes, una de ellas se recubrió con CEA humano (Calbiochem Cat. No.219369, EUA) a 2 µg/pozo, y la otra con seroalbúmina bovina (BSA, Sigma, EUA) a 1 µg/pozo diluidos en PBS 1X, respectivamente y se incubó durante 16 horas a una temperatura entre 10 y 12°C.

Después de bloquear con la adición de 200 µL/pozo de leche descremada al 2% (m/v) diluida en PBS e incubar durante 1 hora a 23°C, se adicionaron a la placa, por duplicado, 100 µL/pozo del fragmento anti-CEA M3 y del anticuerpo completo CB/iorCEA.1, ambos a concentraciones entre 10 y 1000 ng/mL diluidos en PBS-leche al 2% (m/v), y se incubaron durante 2 horas a 23°C.

La placa se lavó de 3 a 5 veces con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) y luego se incubó durante 1 hora a 23°C con 100 µL/pozo de anticuerpos policlonales de conejo anti-fragmento Fab del anticuerpo CB/iorCEA.1 a una concentración de 10 µg/mL diluido en PBS-leche al 2% (v/v). Posteriormente, se lavó la placa como se describió previamente y se incubó durante 1 hora a 23°C con 100 µL/pozo de anticuerpos de carnero anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa (Sigma, EUA) diluidos 1:5 000 en PBS-leche 2% (v/v).

Después de lavar nuevamente, el ELISA se reveló con el uso de 100 µL/pozo de solución sustrato, esta reacción se detuvo por la adición de 50 µL de solución de parada. Finalmente se leyó la absorbancia a 492 nm en el lector de placas *LabSystems Sensident scan* (Finlandia) y se graficaron los datos en el programa *Graphpad prism 4* (EUA) comparándose los resultados obtenidos entre el anticuerpo completo y el fragmento.

3.12 Determinación de la constante de Afinidad del fragmento anti-CEA M3.

3.12.1 Determinación de la afinidad mediante un ensayo Elisa no competitivo.

La determinación de la constante de afinidad del fragmento anti-CEA M3 y el anticuerpo CB/iorCEA.1 se realizó con el empleo de un ELISA no competitivo basado en la ley de acción de masa según describió Beatty y col., en 1987.

Se emplearon para el ELISA placas de polivinilo (Costar, EUA), que se recubrieron con cuatro diluciones seriadas de CEA humano (Calbiochem, Canadá) por duplicado, se comenzó en 2 µg/mL. Las placas se bloquearon con 200 µL/pozo de PBS-leche descremada al 1%, incubándose 1 hora a 37°C. Las muestras del fragmento anti-CEA M3 y el AcM CB/iorCEA.1 se aplicaron (100 µL/pozo) a concentraciones equimolares que comenzaron en 5 µg/mL para el fragmento y en 10 µg/mL para el AcM, luego se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de lavados, los pocillos correspondientes al fragmento se incubaron con el AcM 9E10 (10 µg/mL),

mientras que en aquellos correspondientes al CB/ior-CEA.1 se empleó solución de bloqueo. En el siguiente paso se añadió 100 μL /pozo de un anticuerpo policlonal anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Sigma, EUA), en dilución 1:2500 y se incubó durante 1 hora, a 37°C. Para el revelado utilizamos 100 μL /pozo de solución sustrato y la reacción se detuvo a los 15 minutos mediante la adición de 50 μL /pozo de solución de parada. La lectura de la absorbancia se realizó a 492 nm en un equipo *LabSystems Multiskan MS* (Finlandia).

Los valores de densidad óptica (DO) para cada caso se plotearon en el eje de las ordenadas (y), reflejándose en el eje de las abscisas (x) la concentración expresada en ng/mL en una escala de logaritmo base 10. Se tomó la DO 100 como aquella a la cual la señal se mantenía al máximo. Para cada curva se calculó la mitad de la DO 100 (DO 50). Se determinaron los valores de concentración de la muestra a DO 50 para cada curva, y se realizaron los cálculos de la afinidad mediante la siguiente fórmula: $K_{\text{aff}} = (n-1)/2(n)$, donde $n = [Ab']_t/[Ab]_t$. $[Ab']_t$ es el valor de concentración de la muestra que corresponde a un valor de DO 50 para la concentración mayor de antígeno, $[Ab]_t$ es el valor de concentración de la muestra que corresponde a un valor de DO 50 para la concentración menor de antígeno. Se realizaron las seis determinaciones de afinidad posibles para las 2 curvas obtenidas, calculándose la K_{aff} final como el promedio de estos valores.

3.12.2 Determinación de la afinidad en el BIAcore.

En otro experimento la afinidad del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 se estimó mediante el empleo de un chip de NTA y el equipo *BIAcore 2000* (Pharmacia, Suecia). Los sensores previamente recubiertos con ácido nitriloacético se activaron con 20 μL de una solución 500 $\mu\text{mol/L}$ de NiCl_2 durante 1 minuto a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$. El fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 se diluyó a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS con Tween 20 al 0,1% (v/v) y se inyectó al equipo a una velocidad de flujo de 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$, hasta quedar inmovilizado al sensor por la cola de histidina. El antígeno CEA humano se inyectó a concentraciones desde 0,5 $\mu\text{mol/L}$ hasta 2 $\mu\text{mol/L}$ a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ graficando las curvas de asociación. Seguidamente se inyectó tampón de corrida a 10 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ y se registraron las curvas de disociación.

El cálculo de los parámetros cinéticos y las constantes de asociación y disociación del fragmento anti-CEA M3 se realizaron con el programa de computación *BIAevaluation 2.0* (Pharmacia, Suecia).

3.13 Ensayo de inmunofluorescencia del fragmento anti-CEA M3 sobre células LS 174T.

Para demostrar la especificidad del fragmento anti-CEA M3 sobre el antígeno expresado en la membrana de las células humanas, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia donde se utilizaron las células tumorales humanas LS 174T.

Las células se sembraron en portaobjetos de vidrio (Aubio) y se incubaron durante toda la noche a 37°C y 5% (v/v) de CO₂. Posteriormente, se lavaron dos veces con PBS 1X, luego se dejaron secar a temperatura ambiente, y se fijaron mediante la incubación por 2 minutos a 23°C con una solución fría de acetona-metanol, en proporción 1:1. Después de desechar la solución de acetona-metanol, se dejó secar a esta misma temperatura.

Para el estudio de inmunofluorescencia las placas con las células fijadas se lavaron dos veces con agua destilada y dos veces con PBS 1X-azida sódica 0.02% (m/v). Una muestra del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 a la concentración de 2,5 µg/mL, del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 a la concentración de 10 µg/mL, y del anticuerpo anti-CD6 iorT1 (no relacionado) a la concentración de 10 µg/mL se diluyeron en PBS-BSA 3% (m/v); cantidades fijas de 20 µL de estas diluciones se incubaron sobre las células durante 1 hora a 23°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PBS 1X-azida sódica 0.02% (m/v) y tres lavados con PBS-BSA 3% (m/v). Las placas se incubaron durante 1 hora a 23°C con 20 µL de anticuerpos policlonales de conejo anti fragmento M3 diluidos 1:150 en PBS 1X-BSA 3% (m/v).

Después de lavar como la vez anterior, se adicionaron 20 µL del conjugado anti-IgG de conejo-FITC (Isotiocinato de fluoresceína) producido en carnero (Sigma, EUA), diluido 1:100 en PBS 1X-BSA 3% (m/v), y se incubaron las placas en ausencia de luz a 23°C durante 30 minutos. A continuación se lavaron tres veces con PBS 1X y tres veces con PBS 1X-azida sódica 0.02% (m/v).

Las células se contrastaron con azul de Evans y se lavaron con PBS 1X. Finalmente se les adicionó PBS-glicerol 10% (v/v) y se cubrieron con un cubreobjeto.

Los resultados del ensayo se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus, Japón) usando la luz ultravioleta, la intensidad de la fluorescencia en la membrana celular se evaluó de forma cualitativa usando una escala de cruces, comparando entre el anticuerpo completo y el fragmento de anticuerpo.

3.14 Reactividad del fragmento anti-CEA M3 sobre células tumorales humanas LS 174T mediante la citometría de flujo.

Con el objetivo de realizar un análisis cuantitativo del reconocimiento del fragmento anti-CEA M3 a las células que expresan el antígeno en membrana y compararlo con el anticuerpo completo, así como explorar la posibilidad de contar con un ensayo de actividad biológica para la liberación de los lotes en la producción del fragmento de anticuerpo, se realizó un ensayo de citometría de flujo (FACS) donde se utilizaron 3x10⁶ células LS 174T para cada muestra.

Las células se lavaron con 1 mL de PBS y se centrifugaron a 1 000 g durante 5 minutos. Los fragmentos de anticuerpo presentes en los pico 1 y pico 2 de la cromatografía de gel filtración así como el anticuerpo completo CB/iorCEA.1 se diluyeron en PBS-BSA 2% (m/v) a una concentración de 5 y 10 µg/mL respectivamente. Las células se incubaron con 250 µL de cada preparación de anticuerpo durante 1 hora a 23°C.

Posteriormente, las células se lavaron tres veces con 1 mL de PBS 1X mediante centrifugación a 1 000 g durante 5 min. Finalizado el lavado las células se resuspendieron en 250 μ L de una solución que contenía 30 μ g/mL de anticuerpo policlonal anti-fragmento M3 generado en conejo y diluido en PBS-BSA 2% (m/v), y se incubaron nuevamente durante 1 hora a 23°C. Terminada la incubación las células se lavaron de la misma forma que se describió anteriormente, se adicionaron los anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Sigma, EUA) diluidos 1:100 en PBS-BSA 2% (m/v) y se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a 23°C.

Para finalizar, las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en un volumen final de 1,5 mL de PBS. Un total de 20 000 células se analizaron en el citómetro de flujo (PARTEC FlowMax, Alemania) y los datos se procesaron y se graficaron en forma de punteos por densidad en el programa *Partec FlowMax* (Alemania), calculándose el porcentaje de células fluorescentes.

A los valores de células marcadas obtenidas para cada muestra se le restó el valor del fondo del ensayo estimado al incubar las células solamente con el anticuerpo policlonal anti-fragmento M3 y con el conjugado anti-IgG de conejo-FITC, a las mismas concentraciones que fueron usados durante la incubación con las muestras. El valor del fondo se fijó en 13% de las células marcadas, todo valor por encima de este porcentaje se considero positivo.

3.15 Estudio sobre la estructura del fragmento anti-CEA.

Producto de que en los ensayos de citometría de flujo, el pico 2 de la cromatografía de exclusión molecular mostró reconocimiento al antígeno, cuando según se describe en la literatura este tipo de fragmento no debe presentar actividad biológica, decidimos estudiar más detalladamente las conformaciones moleculares que adquiere el fragmento anti-CEA y que eluyen durante la cromatografía de exclusión molecular como los picos 1 y 2, con el objetivo de definir la estructura dimérica y monomérica de los mismos.

Para estudiar la conformación estructural de estos fragmentos, se realizaron varios estudios que incluyeron la expresión en el vector pAcR.1 de un nuevo fragmento de anticuerpo (denominado L15), para el cual se usaron las mismas secuencias aminoacídicas de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo CB/iorCEA.1, pero en esta ocasión con el empleo de un péptido de unión de 15 aminoácidos entre ambas (Figura 7).

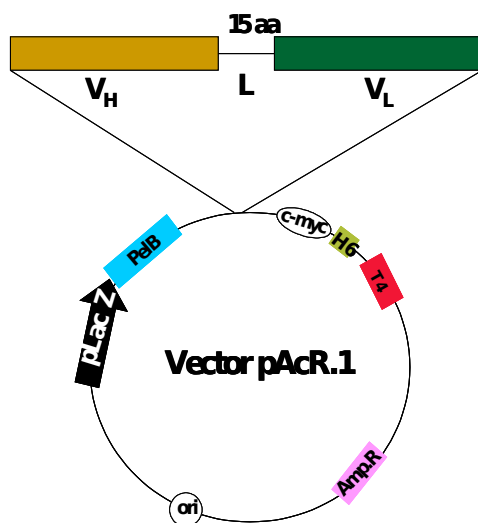


Figura 7: Diagrama de la inserción del gen que codifica para el fragmento anti-CEA L15 en el vector de expresión pAcR.1.

VH: Gen que codifica para la región variable de cadena pesada; **L:** Péptido de unión; **VL:** Gen que codifica para la región variable de cadena ligera; **c-myc:** Péptido etiqueta; **H6:** Péptido de 6 histidinas; **Ter:** Terminador de la transcripción; **AmpR:** gen de resistencia a la ampicilina, **ori:** lugar donde inicia la transcripción **pLacZ:** Promotor de la transcripción, **PelB:** Péptido señal para la secreción al periplasma.

El propósito de obtener una molécula con un péptido de unión de 15 aminoácidos se debe a que este tipo de proteína, generalmente adquiere una conformación monomérica, debido a que la longitud del péptido de unión permite la interacción entre las regiones variables de una misma cadena y forman el sitio de reconocimiento al antígeno.

Disponer de esta molécula permitió realizar comparaciones estructurales con los picos 1 y 2 eluidos de la cromatografía de exclusión molecular, en cuanto al tiempo de retención, el análisis de los pesos moleculares a través de la dispersión dinámica de luz (*Dynamic Light Scattering*) y la determinación del coeficiente de absortividad molar.

3.15.1 Purificación e identificación de los fragmentos anti-CEA y L15.

Los fragmentos anti-CEA y L15 se purificaron mediante cromatografía de afinidad por metales o IMAC, las proteínas presentes en cada etapa del proceso de purificación se observaron en una electroforesis desnaturizante de poliacrilamida al 15% y se inmunoidentificaron mediante *Western blotting* con el empleo del anticuerpo policlonal anti-fragmento M3 realizado en conejos. Posteriormente, las proteínas eluidas en ambos procesos se corrieron en una cromatografía de exclusión molecular con el uso de una columna analítica XK 16/30 y la matriz Superdex 200, previamente calibrada con el mismo patrón de peso molecular y el mismo procedimiento descrito en el acápite 3.9. Los tiempos de retención aparente para los picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA se compararon con el fragmento L15 mediante los perfiles cromatográficos obtenido de cada uno de ellos.

3.15.2 Determinación del coeficiente de absortividad específica de los fragmentos de anticuerpos anti-CEA y L15.

El coeficiente de absortividad específica (a_s) es una constante físico-química de los compuestos y es única según la estructura de los mismos, se determina según la ley de Lambert-Beer (Pace, 1995) la cual plantea que la absortividad específica es constante y la absorbancia de una sustancia es proporcional a la concentración de la misma en un solvente dado y medida en una longitud de onda determinada. Consecuentemente, la absortividad molar es comúnmente llamada coeficiente de extinción molar.

Con la aplicación de la formula: Absort. Molar (a_m) = $a_s \times PM$ (teórico), podemos conocer el coeficiente de absortividad molar o coeficiente de extinción. El valor obtenido de este cálculo se puede utilizar para determinar la concentración exacta de una proteína al emplear la fórmula $Conc (mg/ml) = Abs\ 280nm/a_m$.

Los valores de este coeficiente para los fragmentos presentes en los picos 1, 2 y el fragmento L15 se determinaron con el método propuesto por J. McEntire en 1994. Se prepararon diluciones seriadas de 0,9; 0,7; 0,5; 0,3 y 0,1 mg/mL en tampón final de las proteínas de interés y de la BSA, usada como patrón, y se cuantificaron a una longitud de onda de 275 nm por el método colorimétrico, micro BCA (Pierce, EUA). Posteriormente, se construyó un gráfico en el cual se hace corresponder a cada concentración su valor de absorbancia. La pendiente de la recta obtenida de este ploteo es considerada como el valor del coeficiente de absorptividad específica expresado en mL mg⁻¹cm⁻¹.

3.15.3 Mediciones de la talla molecular de los fragmentos anti-CEA y L15 a través de la difracción dinámica de luz.

La difracción dinámica de luz o espectroscopía de correlación de fotones es una técnica que permite la medición del tamaño de partículas (R) menores de 1 nm de diámetro. Las partículas en suspensión están sujetas a movimientos Browniano y si son iluminadas con un rayo láser, la intensidad de la difracción de la luz varía en un intervalo dependiente de la talla de cada partícula. El análisis de la intensidad de las fluctuaciones proporcionadas por la velocidad de los movimientos Brownianos permite una aproximación a la talla de las mismas.

El tamaño de las moléculas y la homogeneidad de las preparaciones correspondientes a los picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA purificados, así como del fragmento L15 se determinaron mediante la difracción dinámica de la luz, con el empleo del equipo *DynaPro light scattering* (Proterion Corporation, EUA). Los datos obtenidos en este estudio se analizaron con el programa DYNAMICSTM (EUA).

3.16 Escalado en la producción del fragmento anti-CEA M3.

Con el fin de obtener las cantidades requeridas para poder realizar los experimentos preclínicos y los estudios clínicos se realizó un escalado en la fermentación (hasta 5 L) de la producción del fragmento de anticuerpo que habíamos estudiado a escala de laboratorio.

Para la producción del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 a una mayor escala se comenzó con la inoculación de 1 mL de bacterias transformadas con el plasmidio de interés, perteneciente a los gliceroles del banco de células de trabajo que se realizaron previamente siguiendo los requerimientos exigidos por el departamento de control de la calidad del CIGB, en un elenmeyer de 500 mL que contenía 100 mL de medio de cultivo 2xYT, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 2% (v/v) de glucosa. El cultivo se incubó en zaranda a 37°C y 250 rpm durante 17 horas.

Con el cultivo anterior se sembraron 2 elenmeyers de 2 L con 400 mL de medio de cultivo 2xYT cada uno, suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y 2% (v/v) de glucosa, hasta alcanzar una A_{630nm} de 0,1, el mismo se incubó en zaranda a 37°C y 250 rpm hasta una A_{630nm} de 0,8.

Con el cultivo anterior se inoculó un fermentador de 5 L preparado con 4,2 L de medio de cultivo 2xYT, suplementado con glucosa 2% (v/v) y 100 µg/mL de ampicilina. El mismo se incubó durante 5 horas a 37°C, 250 rpm, pH 6,8 y 1vvm de O₂ disuelto, hasta alcanzar una A_{630nm} entre 0,8 y 1,0. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 5 000 g, y 4°C, durante 30 minutos, las células sedimentadas se resuspendieron en 1 L de medio de cultivo YTBS y se sembraron en un nuevo fermentador de 5 L que contenía 4 L de medio YTBS suplementado 100 µg/mL de ampicilina y 1 mmol/L de IPTG y se incubó durante 16 horas a 28°C, pH 6,8 y 1vvm de O₂.

Finalmente el cultivo se colectó y se centrifugó a 10 000 g durante 30 minutos, se excluyó el sobrenadante de cultivo y se guardó a -70°C la biomasa celular.

Con el fin de aumentar la eficiencia durante el proceso de ruptura celular se empleó la prensa de French, el cual es un método más eficiente y que permite el procesamiento de mayor cantidad de biomasa.

Para la ruptura, la biomasa celular (100 g) se resuspendió en 110 mL de tampón de extracción, y se homogenizó en un agitador tipo rotor-estator (Polytron, IKA, Suiza). La muestra se mantuvo todo el tiempo en hielo. La ruptura se realizó mediante tres ciclos a una presión entre 1200 y 1500 bar y terminada la misma se adicionaron 110 mL más del tampón de extracción y se homogenizó nuevamente. El producto de la ruptura se centrifugó a 12 000 g y 4°C durante 90 minutos, y se separó la fracción soluble de la insoluble. La fracción soluble se colectó en un frasco limpio se adicionó 5 mmol/L de imidazol y se colocó en hielo.

Para la purificación por IMAC se utilizó una columna XK 16/20 (Amersham-Pharmacia, EUA) preparada con 20 mL de matriz Ni-NTA (Sigma-Aldrich, EUA) y se procedió de igual forma a lo descrito anteriormente en el acápite 3.8.2. En un inicio se utilizó durante el paso de lavado el tampón de lavado 1 que contiene una concentración de imidazol de 50 mmol/L, pero debido a la pérdida de proteína de interés observada en el mismo se decidió emplear durante este paso el tampón de lavado 2, que contiene una concentración de imidazol de 25 mmol/L y se compararon los rendimientos y la pureza final de los dos procesos.

La pureza de las fracciones eluidas de esta cromatografía se analizaron en una electroforesis desnaturalizante en presencia de SDS al 15% y se inmunoidentificaron en *Western blotting* con el empleo del anticuerpo policlonal anti-fragmento M3. Las fracciones se procesaron mediante densitometría digital y la aplicación de la metodología descrita en el acápite 3.7.2. El porcentaje del fragmento anti-CEA presente en cada fracción se estimó por este método.

Como segundo paso de purificación se realizó una cromatografía de exclusión molecular donde se empleó una matriz de Superdex 200 y una columna preparativa XK-26/70 (Amersham-Pharmacia, EUA), la cual se calibró previamente con un patrón de bajo peso molecular con las siguientes proteínas: ribonucleasa A (13,7 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa), ovalbúmina (43 kDa), albúmina (67 kDa) (Pharmacia, Suecia). La misma se equilibró con tampón final de

conservación a un flujo de 1 mL/minuto. En cada corrida se aplicaron 3 mL de la muestra a una concentración de 0,5 mg/mL y se colectaron por separado la elución de los picos 1 y 2.

Finalmente, las eluciones del pico 1 (fragmento anti-CEA M3) se unieron y se concentraron en un concentrador de ultrafiltración (Amicon, EUA) con una membrana clase 10 000 (límite de talla molecular de proteínas: 10 kDa) hasta 1,2 mg/mL, se filtraron por membrana de 0,2 μm y se almacenaron a -20°C en viales de centrifugación de 1,5 mL (Eppendorf, Alemania) a razón de 1 mL por vial, hasta su evaluación en electroforesis de poliacrilamida al 15% (v/v) y *Western blotting*.

3.17 Estudio de Formulación y Estabilidad del fragmento anti-CEA M3.

Con el objetivo de definir la formulación final y el periodo de estabilidad del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3, que permitiera su empleo en los estudios clínicos se realizaron varios estudios de formulación y estabilidad.

3.17.1 Estudio de la Formulación.

Se realizaron dos ensayos de formulación del fragmento anti-CEA M3. En un primer estudio se analizó la influencia del pH y la concentración de NaH_2PO_4 en la estabilidad de la molécula. Previamente se eliminó el contenido de NaCl para evitar posible interferencias durante la liofilización. Para ello se dializaron las proteínas correspondientes al pico 1 de la purificación por exclusión molecular contra tampones que contenían solamente 17,86; 35,07 y 100 mmol/L de NaH_2PO_4 , cada uno de ellos con pH ajustado de 6.5, 7.0 y 7.8, posteriormente las muestras se diluyeron hasta concentraciones de 0,25 mg/mL y se incubaron en forma líquida a 45°C . Simultáneamente una muestra del fragmento se liofilizó en el tampón de gel filtración con la adición de 2% (m/v) de sacarosa.

La estabilidad de la molécula se analizó a los 0, 5 y 10 días de incubación, estimándose la concentración por absorbancia a 280 nm, la pureza en electroforesis de poliacrilamida al 15% (v/v) y en cromatografía de gel filtración, la identidad en *Western blotting* y la actividad biológica por citometría de flujo siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

Durante el segundo estudio de preformulación se mantuvieron las concentraciones originales del tampón de gel filtración. En este caso se analizó la influencia sobre la estabilidad de los picos 1 y 2 de la adición en el tampón de gel filtración de 5 mmol/L de EDTA y la reducción del pH desde 7.8 a 6.0.

La elución del fragmento anti-CEA en la purificación por IMAC se subdividió en dos fracciones, con y sin EDTA, y se realizaron cromatografías de gel filtración con los tampones de gel filtración con y sin EDTA y pH ajustado a 6.0 y 7.8. Los pico 1 y 2 se colectaron por separado y se incubaron a 4 y -20°C durante 20 días. Estas variantes además se liofilizaron después de adicionarles 2% (m/v) de sacarosa y se incubaron a 45°C durante 15 días con el fin de realizar un

estudio de estabilidad acelerada. La pureza de cada uno de los picos fue seguida mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% (v/v) en condiciones desnaturalizantes.

La formulación final se denominó tampón final de conservación.

3.17.2 Estudio de la Estabilidad.

Para el estudio de estabilidad en tiempo real se tomaron muestras purificadas de 2 lotes producidos en diferentes momentos a una escala de fermentación de 5 L. Las proteínas se envasaron a un volumen de 0,3 mL y una concentración de 1 mg/mL en el tampón final de conservación en frascos de vidrios limpios y estériles.

En el caso del producto intermedio, llamado ingrediente farmacéutico activo (IFA) los bulbos se almacenaron en una cámara fría con temperatura de -20°C , mientras que el producto final se liofilizó después de adicionarle 2% (m/v) de sacarosa y se conservó a una temperatura de 4°C .

Se establecieron los parámetros de calidad y se diseñó un cronograma de toma de muestras con una frecuencia mensual hasta los 6 meses, durante cada muestreo se les realizaron los siguientes estudios:

- 1-Determinación de la pureza de la proteína por electroforesis (SDS-PAGE) al 15%.
- 2-Determinación de la pureza por HPLC-Gel filtración, con el empleo de la matriz Superdex 200.
- 3- Inmunoidentificación por *Western Blotting*, con el anticuerpo policlonal anti-fragmento M3.
- 4- Concentración de proteínas totales mediante la Absorbancia a 280 nm.
- 5-Contaminantes de ADN por hibridización con sonda radioactiva.
- 6- *Dot Blotting* de proteínas contaminantes con el uso de un anticuerpo policlonal anti-proteínas de bacteria.
- 7- Actividad Biológica por citometría de flujo con el empleo de las células LS 174T.

Cada muestra que se tomó para el análisis se observó para determinar sus características organolépticas: color, transparencia y ausencia de precipitado. Se evaluaron todos los parámetros que presentaba el material al inicio del estudio de estabilidad, que quedó establecido como el tiempo 0 de la estabilidad. Los límites de aceptación de cada parámetro se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Análisis realizados durante el estudio de Estabilidad del fragmento y especificaciones de calidad.

Análisis	Referencias	Límites de aceptación
Determinación de pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	PPO 4.09.004.91 PPO 4.09.005.91	$\geq 95\%$ pureza
Determinación de pureza por HPLC-Gel Filtración	PPO 4.09.284.95	$\geq 80\%$ de Dímeros $\geq 20\%$ de Monómero
Contaminantes de ADN por hibridización del ADN	PPO 4.09.080.91	$<100\text{pg/ dosis}$
Inmuno Identificación por <i>Western Blotting</i> .	PPO 4.09.044.92	Identificado

Proteínas contaminantes del hospedero por <i>Dot Blotting</i>	PPO 4.09.218.01 PPO 4.09.312.96	1,5% de la dosis de 50 µg
Actividad Biológica por FACS	Citometría de Flujo PPO 5.63.002.05	Reconocimiento \geq 50% de células marcadas y \leq 13% de fondo del blanco
Concentración de Proteínas totales por Absorbancia	PPO 4.09.057.92	Entre 0,8 y 1,6 mg/mL

PPO: Procedimientos prácticos de operaciones.

3.18 Secuencia de aminoácidos del fragmento anti-CEA M3.

El estudio de la secuencia de aminoácidos de la proteína permite confirmar la presencia y posición de cada aminoácido y de los puentes disulfuro que son fundamentales para la conformación activa de los anticuerpos. Pero además, esta secuencia permite confirmar que los extremos amino y carboxilo terminales de la proteína no sufrieron alteraciones debido a la manipulación genética.

Para analizar la secuencia aminoacídica del fragmento anti-CEA M3 mediante espectrometría de masa, el fragmento se disolvió en 1% (v/v) de tampón NH_4HCO_3 pH 8.3 suplementado con 2 mol/L de Urea y se digirió con tripsina grado secuencia (Promega, EUA). Se usó una relación enzima:sustrato de 1:50 durante 4 horas a 37°C. La digestión se bloqueó con la adición de 1% (v/v) de ácido trifluoroacético hasta alcanzar un pH ácido (aproximadamente 2.0).

Los péptidos tripticos se purificaron en una columna RP-C18 (LC Packing; 15 cm x 300 µm ID) en el equipo de cromatografía líquida AKTA (Amersham Pharmacia Biotech, Suiza). Los péptidos se eluyeron de la columna en 50 minutos mediante un gradiente lineal desde 5 hasta 60% de acetonitrilo con 0,2% (v/v) de ácido fórmico a un flujo de 3 µL/minuto.

Los espectros de masas se adquirieron en un espectrómetro de masas híbrido con geometría ortogonal QTOF-2™ (Micromass, UK) equipado con una fuente de ionización nanospray. Los voltajes del capilar de borosilicato y el cono de entrada se fijaron a 900 Volts y 35 Volts, respectivamente. La entrada de la aguja se presurizó ligeramente para garantizar una buena calidad en el spray durante toda la medición. El espectrómetro de masas se calibró con una mezcla de yoduro de sodio y cesio en el rango de 50-2 000 Da para la medición de péptidos. Para medir la proteína intacta se utilizó un calibrador externo (Quimotripsinógeno) y se midió en un rango de entre 600-2 500 Da. El primer cuadripolo se fijó a una resolución de 2 a 3 Th para seleccionar el ión precursor a fragmentar. El gas de colisión fue argón y la energía de colisión empleada osciló entre 25 y 35 eV. El software de procesamiento de los espectros de masas empleados fue el *MassLynx* versión 3.5 (Micromass, UK).

3.19 Marcaje radioactivo del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3.

Una de las principales utilidades que presenta tanto el fragmento anti-CEA M3 como el anticuerpo CB/iorCEA1, del cual proviene, para ser empleado en el diagnóstico o la terapia del cáncer, esta basada en la posibilidad de transportar drogas, agentes químicos o isótopos radioactivos directamente hacia el tumor.

La conjugación de estas moléculas a los radionúclidos puede originar inestabilidad en el radioconjugado e incluso anular la actividad biológica de la proteína. Esto explica la necesidad de realizar estudios sobre la conjugación del fragmento a los radionúclidos antes de emplearlas en el radioinmuno diagnóstico o la radioinmunoterapia.

En nuestro caso utilizamos los isótopos yodo 125 y 131 y estudiamos la estabilidad, inmunoreactividad y afinidad del fragmento después de marcado.

Los isótopos de yodo usados en el radiomarcaje del fragmento de anticuerpo procedieron del Centro de Isótopos (CENTIS, La Habana, Cuba), de donde se obtienen en forma de NaI, en solución de NaOH 0,1 mol/L, pH 8-10.

3.19.1 Radiomarcaje del fragmento anti-CEA M3 con el isótopo ¹²⁵I.

Para los experimentos de radiomarcaje se utilizó el método de la cloramina T (Hunter y col., 1962).

Se partió de 20 µg del fragmento anti-CEA M3, el pH de la solución se ajustó a 7.0 y seguidamente se adicionaron 0,3 µL de ¹²⁵I, equivalentes a 40 µCi. Se agitó suavemente en un mezclador, se adicionaron 10 µL de cloramina T preparada a una concentración de 1 µg/µL y se dejó reaccionar durante 2 minutos a 25°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 4 µL de meta bisulfito de sodio diluido a una concentración de 2 mg/mL.

La pureza radioquímica del radiofármaco se determinó mediante cromatografía ascendente en placa fina, con el uso del papel cromatográfico Whatmann 3 MM como fase estacionaria y solución salina fisiológica 0,9% (m/v) como fase móvil, después de la corrida, el papel se secó al aire y se cortó en secciones de 1,0 cm, la radioactividad de cada sección se midió en el contador gamma (1272 Clinigamma, LKB Wallac, Suecia). El yodo libre migra hacia las secciones superiores del papel por lo cual se estimó que por ciento respresenta este de la radioactividad presente en el punto de aplicación, que es el isótopo unido a la molécula.

Posteriormente, el fragmento de anticuerpo radiomarcado se purificó mediante una cromatografía de exclusión por tamaño molecular, con el objetivo de separar el exceso de isótopo radioactivo no incorporado. Como soporte se usó la matriz Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, Suecia) en una columna de 1,2 x 20 cm. La pureza final se determinó mediante una nueva cromatografía ascendente en capa fina.

3.19.2 Radiomarcaje del fragmento anti-CEA M3 con el isótopo ¹³¹I.

Para el marcaje del fragmento anti-CEA M3 con ¹³¹I se partió de 50 µg del fragmento puro, en este caso se utilizaron 1,48 MBq (40 µCi) de ¹³¹I para un marcaje a una baja actividad específica y 11,1 MBq (300 µCi) de ¹³¹I para el marcaje a una alta actividad específica (2,5 mCi/mg y 0,21 GBq/mg), respectivamente. Al igual que en el caso anterior el pH de la reacción se ajustó a 7.0 y se adicionaron 10 µL de cloramina T (1 mg/mL). La solución se agitó suavemente durante 2 minutos a 25°C, y la reacción se detuvo por la adición de 4 µL de

metabisulfito de sodio (2 mg/mL). El porcentaje de marcaje y la pureza del fragmento radiomarcado se estimaron como se describe en el acápite 3.19.1.

3.20 Estabilidad *in vitro* del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado.

La estabilidad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{125}I y ^{131}I se analizaron mediante cromatografía en FPLC con el uso de una columna HR 10/30 de Superosa 12 (Pharmacia, Suecia), a un flujo de 1 mL/minuto, calibrada con un juego de patrones de peso molecular para proteínas de baja talla (ribonucleasa A (13,7 kDa); quimotripsinógeno A (25 kDa); ovalbúmina (43 kDa); albúmina (67 kDa), (Pharmacia, Suecia).

Durante las corridas se colectaron fracciones de 1mL y la radioactividad de cada una se midió en el contador gamma (Clinigamma 1272, LKB Wallac, Suecia), los valores en cpm obtenidos en los conteos de la radioactividad para cada una de las fracciones se graficaron en un radiocromatograma, y se determinó la integridad de la molécula marcada mediante la comparación con una cromatografía realizada en la misma columna de la molécula sin marcar.

En el caso del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I a baja y alta actividad específica, se analizó además la estabilidad *in vitro* con la incubación de 5 μL (0,4 mg/mL) del fragmento radiomarcado, en 500 μL de suero humano y en 500 μL de PBS ambos a una temperatura de 37°C.

La estabilidad y la pureza del fragmento radiomarcado se controló por cromatografía ascendente de capa fina, mediante la toma de muestras de ambas incubaciones a las 12, 24, 48 y 72 horas después del marcaje. Se calculó mediante cromatografía ascendente en capa fina el porcentaje de isótopo libre presente en cada preparación.

3.21 Determinación de la inmunoreactividad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado.

Teniendo en cuenta que la unión de los isótopos radioactivos a determinados aminoácidos puede comprometer la estructura terciaria de la proteína y afectar su actividad biológica, se necesitó comprobar que el fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 mantenía el reconocimiento al antígeno después de marcado con los isótopos ^{125}I y ^{131}I .

Para determinar la inmunoreactividad del fragmento y una vez establecido el método de la cloramina T para el marcaje de la molécula con NaI radioactivo, se realizaron dos experimentos, tanto sobre el antígeno puro como sobre las células humanas LS 174T que expresan el CEA en membrana.

3.21.1 Inmunoreactividad del fragmento anti-CEA M3- ^{125}I sobre células que expresan CEA.

El experimento de inmunoreactividad del fragmento marcado con ^{125}I se realizó sobre células que expresan el antígeno carcinoembrionario en membranas. En este caso se realizó una adaptación al método descrito por Lindmo y col. en 1984.

Se utilizaron las células humanas LS 174T cultivadas en medio RPMI suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y 50 µg/mL de gentamicina, las cuales se sembraron en una placa de 24 pozos a concentraciones de 5×10^5 ; $2,5 \times 10^5$; $1,25 \times 10^5$; $0,625 \times 10^5$; $0,31 \times 10^5$; $0,15 \times 10^5$ células/pozo (columnas A,B,C,D), empleándose cuatro pozos para cada concentración. Las células se incubaron durante 4 días a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Posteriormente, se procedió a fijar las células a la placa, para lo cual se eliminó el medio y se lavaron dos veces los pozos con 500 µL de PBS con el cuidado de no desprenderlas. Se les adicionaron 200 µL/pozo de una solución fría de acetona:metanol (1:1) y se incubó durante 2 minutos a 23°C, al cabo del cual se eliminó esta solución y se dejó secar la placa a 23°C.

Un total de 100 µg (1,5 mg/mL) del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 y 300 µg (5 mg/mL) del anticuerpo CB/iorCEA.1 se marcaron con 79 µCi de ¹²⁵I respectivamente siguiendo la metodología descrita en el epígrafe 3.19.1. Luego de purificar los radiofármacos por cromatografía de gel filtración (G-25) se tomó una cantidad de 11 µL (677,4 ng) del fragmento y 30 µL (2 µg) del anticuerpo y se diluyeron hasta un volumen total de 7,8 mL con PBS-BSA 1% (m/v).

En los pozos del A1 al A6 y del B1 al B6 de la placa recubierta con células se aplicaron 300 µL (26 ng) de la dilución del fragmento marcado, en el pozo B1 se aplicó además, 130 µL (200 µg) de fragmento sin marcar. Por su parte en los pozos del C1 al C6 y del D1 al D6 se aplicaron 300 µL (76,9 ng) de la dilución del anticuerpo marcado, en el pozo D1 se adicionó también 40 µL (200 µg) de anticuerpo frío. El volumen de cada pozo se completó hasta 430 µL con PBS-BSA 1% (m/v).

Luego de colocadas las muestras en cada pozo, la placa se incubó durante 2 horas a temperaturas entre 23-25°C. Al terminar la incubación se lavó la misma, una vez con agua destilada y dos veces con PBS (pH 7.4), se adicionó 400 µL de una solución de NaOH 2N en cada pozo y se incubó con agitación durante 30 minutos a temperatura entre 23-25°C para desprender la monocapa celular. Posteriormente, se recogió el contenido de cada pozo y se lavó con 500 µL/pozo de PBS. Tanto el contenido de la incubación con las muestras como el lavado se dispensaron en tubos de conteo y se midió la radiactividad en el contador gamma (Clinigamma 1272, LKB Wallac, Suecia).

El porcentaje del total, tanto de fragmento como de anticuerpo completo, que quedó unido al CEA (designado como %B/T) para cada concentración celular se determinó mediante la fórmula:

$$\%B/T = \frac{\text{conteo}(cpm)\text{enCélula}}{\text{conteo}(cpm)\text{Patrón}} \times 100$$

Donde B, es el valor en cpm de la cantidad de fragmento o anticuerpo marcado que quedó unido a las células; después de sustraerle el valor de la unión inespecífica, que se obtiene con la

incubación de las células con un exceso de anticuerpo o fragmento frío. T: es el total de fragmento o anticuerpo marcado que se utilizó en la incubación.

Para calcular el valor de inmunoreactividad se ploteó en una grafica el inverso de los valores de %B/T contra el inverso de la concentración celular y se dividió 1 entre el intercepto de la recta en Y.

3.21.2 Inmunoreactividad del fragmento anti-CEA M3-¹³¹I contra el CEA humano en solución.

La inmunoreactividad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I se estimó con el antígeno CEA en solución mediante el método descrito por Wu y col. 1999.

Para estudiar el efecto del marcaje radioactivo sobre la unión del fragmento a su antígeno; 75 ng de fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I a baja y alta actividad específica, se incubaron con 1 µg de CEA (Calbiochem, EUA) durante 1 hora en solución a 25°C. Tanto la muestra del fragmento radiomarcado e incubado con el antígeno como una muestra del fragmento radiomarcado sin antígeno, se analizaron mediante FPLC con el empleo de una columna 10/30 HR y la matriz Superosa 12 (Pharmacia, Suecia). El flujo de corrida durante las purificaciones fue de 1 mL/minuto y se colectaron fracciones de 1 mL. La radioactividad de cada fracción se midió en el contador gamma y los valores de actividad radioactiva en cpm se graficaron en un radiocromatograma.

El porcentaje de la fracción inmunoreactiva del fragmento anti-CEA M3 se estimó a partir del radiocromatograma, mediante el análisis de la integración del área bajo la curva correspondiente a la fracción radiomarcada del complejo antígeno-anticuerpo y su comparación con la fracción del fragmento radiomarcado que no reacciona con el antígeno. El radiocromatograma del fragmento radiomarcado sin antígeno nos permitió comparar los tiempos de retención y la integridad de ambos.

3.22 Ensayo de competencia para estimar la afinidad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹²⁵I.

Con el objetivo de evaluar el efecto que pudo provocar el marcaje radioactivo sobre la afinidad del fragmento por su antígeno se realizó un ensayo de competencia entre el fragmento marcado y sin marcar y se compararon los resultados con el anticuerpo completo utilizado en el mismo experimento.

Las constantes de asociaciones aparentes del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 y del fragmento de anticuerpo radiomarcados con yodo 125 se estimaron mediante un ensayo de competencia (tipo Scatchard) realizado sobre las células tumorales LS 174T que expresan el CEA y siguiendo la metodología descrita por Clarke y col., 2000.

Las células LS 174T se sembraron en una placa de 24 pozos a concentraciones fijas de 5×10^5 células/pozo, y se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino y gentamicina durante 4 días a 37°C en atmósfera de 5% (v/v) de CO₂. Para fijarlas a la

placa se adicionaron 200 μL /pozo de acetona:metanol (1:1) frío, se incubaron durante 2 minutos a temperatura entre 23-25°C, pasado este tiempo se eliminó esta mezcla y se dejaron secar a igual temperatura.

Se prepararon diluciones del fragmento anti-CEA M3 y del anticuerpo completo, a partir de una solución de 1 mg/mL, ambos sin marcar. Las concentraciones se ajustaron desde 0.064 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-BSA 1% (m/v). A cada dilución se le adicionaron cantidades fijas de 15 ng y 45 ng del fragmento anti-CEA M3 y el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 respectivamente radiomarcados con ^{125}I . En los pozos de las filas A y B se adicionaron 250 μL por pozo de cada dilución del fragmento y en las filas C y D se adicionaron 250 μL por pozo de cada dilución del anticuerpo.

Las células se incubaron durante 1 hora a temperatura entre 21 y 23°C. Posteriormente, se lavaron tres veces con PBS 1X y se adicionaron 400 μL de NaOH 2N a cada pozo. Se incubó 30 minutos a temperatura entre 21 y 23°C con agitación para desprender la monocapa celular. Por último, se recogió todo el contenido de los pozos y se lavaron con 500 μL de PBS por pozo, las células se vertieron en tubos de conteo y se midió la radiactividad en el contador gamma. Una cantidad de fragmento o anticuerpo marcado similar a la empleada se mantuvo como patrón.

Para determinar la constante de asociación (K_a) del fragmento y el anticuerpo completo se calculó la cantidad de fragmento o anticuerpo para cada dilución que quedó unido específicamente a las células (B) mediante la multiplicación del valor promedio en cpm, obtenido después de restar el fondo y dividir el valor del patrón, por el valor de la concentración del anticuerpo frío en mmol/L. La cantidad de anticuerpos libres (F) se estimó sustrayendo la cantidad que quedó unida del total de anticuerpos.

Posteriormente, se determinó la relación de anticuerpos unidos entre el total de anticuerpos libres (B/F), estos valores se graficaron contra la concentración molar del total de anticuerpos unidos (B). Se obtuvo una línea recta donde el valor de la pendiente se correspondió con el valor de la K_a .

3.23 Experimentos en animales con el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado.

Con el objetivo de analizar el comportamiento del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 marcado con el ^{125}I y con ^{131}I en un modelo animal se realizaron varios experimentos de Biodistribución en ratones.

Para los primeros experimentos se utilizaron ratones sanos de la cepa NMRI que se inyectaron con el fragmento radiomarcado con ^{125}I . Se realizó la evaluación de la biodistribución del mismo en varios órganos.

Para los estudios de biodistribución en animales atómicos se utilizaron ratones Balb/c *nunu* de ambos sexos suministrados por el Centro Nacional para Animales de Laboratorios (CENPALAB, Cuba). Para la inducción de tumores se utilizó la línea celular humana de adenocarcinoma de colon LS 174T. Las células se inyectaron en medio libre de suero inmediatamente después de

cosechadas, por vía subcutánea en la región dorso lateral derecha anterior, a razón de $4-5 \times 10^6$ células por animal y en un volumen de aproximadamente 200-400 μL . Los ratones se mantuvieron en observación hasta que los tumores alcanzaron un volumen promedio superior a 150 mm^3 .

Después de inyectados los animales con el fragmento radiomarcado y a los tiempos de muestreo establecidos, se extrajeron los órganos principales y el tumor, estos se lavaron en PBS, se pesaron y se colocaron en tubos de forma separada, la radioactividad de cada uno se midió en el contador gamma (CliniGamma counter LKB, Suecia).

Para estimar el porcentaje de la dosis inyectada entre el peso de los órganos (%ID/g) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%ID/g = \frac{\text{conteo}(cpm)\text{delTejido}}{\text{conteo}(cpm)\text{Patrón}} \times \frac{100}{\text{Peso}(g)}$$

Además para analizar la acumulación del fragmento en el tumor y tener un estimado de su permanencia en cada órgano se determinó la relación existente entre los valores de %ID/g obtenidos en cada uno de ellos con el valor de %ID/g de la sangre y del tumor, mediante la división de ambos valores.

3.23.1 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{125}I .

Para el análisis de la biodistribución del fragmento marcado con ^{125}I se utilizaron 15 ratones atómicos xenotrasplantados con $4-5 \times 10^6$ células humanas LS 174T, se administraron dosis de 5 μg del fragmento marcado con 5 μCi de ^{125}I , disueltos en 50 μL de solución salina por vía intravenosa (plexo retrorbital). Un total de cinco ratones se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas después de la administración y se les extrajeron los siguientes órganos y tejidos: sangre, hígado, bazo, pulmón, corazón, riñón, intestino delgado, intestino grueso, estómago, músculo, hueso y tumor. Cada órgano se pesó en una balanza analítica y la radioactividad en cpm de cada uno se midió en el contador gamma (Clinigamma 1272, LKB Wallac, Suecia).

Para corregir el decaimiento del isótopo, una cantidad igual a la dosis inyectada se mantuvo como patrón de la calibración del conteo de cpm para cada tiempo. A los valores obtenidos en cada órgano se le sustrajo el valor del fondo y se dividió entre el valor del patrón, la estimación del %ID/g se realizó tal y como se describe en el acápite 3.23.

Con el objetivo de determinar la acumulación específica en el tumor se analizó la relación entre los valores de %ID/g del tumor con los valores de %ID/g de los tejidos más vascularizados (sangre, pulmones y bazo), así como entre los principales órganos excretores (hígado y riñones). Para ello se procedió como se describe en el acápite 3.23.

3.23.2 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I .

La biodistribución del fragmento marcado con ^{131}I , se realizó en 12 ratones atómicos con una edad de entre 4 y 6 semanas, xenotrasplantados con $4-5 \times 10^6$ células de tumor humano LS 174T, después de que los tumores alcanzaron un volumen aproximado de 150 mm^3 , los

ratones se inyectaron con 5 µg de fragmento marcado con 12 µCi de ^{131}I (0,0917 GBq/mg) en un volumen de 150 µL por vía intravenosa (plexo retrorbital), 3 animales se sacrificaron a las 2,5; 24; 48 y 72 horas. Tanto el tumor como el resto de los tejidos, incluso la sangre, se colectaron y se pesaron en una balanza analítica. La radioactividad de cada tejido se midió en el contador gamma (Clinigamma 1272, LKB Wallac, Suecia). Al igual que en el acápite anterior un patrón por duplicado de la dosis inyectada se midió en cada tiempo con el propósito de corregir el decaimiento del isótopo, el calculo del % de dosis inyectada (ID) entre los gramos de tejidos (g) se realizó como se describe en el acápite 3.23.

La relación entre los valores de %ID/g en el tumor y el resto de los tejidos se analizó como se describe en el acápite 3.23. Se estudió además la relación entre el hígado y la sangre y entre los riñones y la sangre.

3.23.3 Gammagrafía en ratones con el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I .

En otro experimento y teniendo en cuenta que el isótopo ^{131}I es también un emisor gamma de alta energía, que puede ser empleado en imágenes, dos ratones atímicos xenotransplantados con células tumorales humanas LS 174T, se inyectaron con 5 µg del fragmento anti-CEA M3 marcado con 150 µCi de ^{131}I (0.21GBq/mg) por vía retrorbital, con el objetivo de realizar una biodistribución a través de imágenes gammagráficas.

Las imágenes se tomaron a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección, el animal se anestesió previamente y se utilizó una cámara GE 400T (General Electric, EUA) con un colimador de alta energía.

3.24 Estudio del Fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I en Pacientes con cáncer colorectal.

Con el objetivo de evaluar la utilidad del fragmento anti-CEA M3 en humanos y en el marco de un ensayo clínico fase I aprobado por las autoridades regulatorias, se estudiaron en pacientes con cáncer colorectal los primeros indicios sobre la seguridad biológica, la estabilidad, la farmacocinética y la captación tumoral mediante gammagrafía del fragmento radiomarcado con ^{131}I . Para este estudio el fragmento de anticuerpo fue producido siguiendo las buenas prácticas de fabricación requeridas para el uso en humanos (Richter, 2004) y sometido a los controles de calidad establecidos en la unidad de desarrollo farmacéutico del CIGB para estos productos.

Se utilizaron cinco pacientes adultos con diagnóstico confirmado de la presencia de tumor en las regiones de colon y/o recto sin tratamiento oncoespecífico previo y positivos por inmunohistoquímica para la presencia del antígeno CEA en el tejido tumoral. A cada uno de los pacientes se le ofreció la información completa sobre el producto y el ensayo y ofrecieron su consentimiento de participación (Anexo 5).

Antes de administrar el producto se les indicó el consumo de 10 gotas de solución de lugol tres veces al día con el objetivo de evitar la acumulación del yodo libre en la tiroides y se les midió el valor de CEA sérico.

A cada uno se les administró, por vía intravenosa en forma de bolo, una dosis de 0,3 mg del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 radiomarcado con 5-7 mCi de ¹³¹I. La presencia de anticuerpos anti-fragmentos en el suero de cada uno de los pacientes se evaluó antes, 15 días y 1 mes después de la administración del fragmento mediante un ensayo ELISA, detalles del ensayo más adelante en el acápite 3.24.4. El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Oncología y cada paciente permaneció ingresado durante 72 horas.

3.24.1 Estabilidad en el suero de los pacientes y excreción por la orina del fragmento anti-CEA M3-¹³¹I.

La presencia e integridad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I en el suero de cada paciente se analizó mediante cromatografía en FPLC.

Un total de 50 µL de cada una de las muestras de suero tomadas a los 30 minutos y a las 2 y 24 horas se filtraron por 0,2 µm y se aplicaron en una columna 10/60 HR de Superosa 12 (Pharmacia, Suecia), el flujo de trabajo fue de 0,5 mL/minuto y el tampón de corrida usado fue solución salina 0,9% (m/v), se colectaron fracciones a intervalos de 1 minuto y su actividad radioactiva se midió en el contador gamma.

Con los valores obtenidos en cpm se realizó un radiocromatograma graficando los conteos de cada fracción contra el tiempo. Los gráficos resultantes se compararon con un gráfico control, que consistió en 50 µL de la dosis inyectada del fragmento radiomarcado con ¹³¹I.

Para conocer el porcentaje de radioactividad asociada al fragmento anti-CEA M3 en cada determinación se procedió a precipitar las proteínas presentes en 1 mL de suero obtenido a los 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 horas, con ácido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v). Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 23°C y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos, separando el sobrenadante del precipitado. Las proteínas precipitadas se lavaron en dos ocasiones con PBS y se midieron los cpm de ambas fracciones en el contador de centelleo.

Se determinó, además, el porcentaje de excreción del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I a través de la orina. Para ello se colectó toda la orina excretada en los intervalos de tiempo de 0-2 horas, 2-8 horas, 8-24 horas, 24-48 horas y 48-72 horas. Para cada intervalo de tiempo, se midió el volumen de la misma usando una probeta graduada y se colectaron 2 viales de 1 mL, que se midieron en el contador de centelleo. Las proteínas presentes en 1 mL de orina se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% (v/v). Después de centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos se separó el sobrenadante del precipitado, este último se lavó en dos ocasiones con PBS y se midieron en el contador gamma. Un patrón correspondiente a la dosis inyectada se midió en cada tiempo junto con las muestras, para sustraer el decaimiento del isótopo.

3.24.2 Farmacocinética del Fragmento anti-CEA M3-¹³¹I en el suero de los pacientes.

El estudio de farmacocinética se realizó al calcular el porcentaje de la dosis inyectada del fragmento radioactivo presente en el suero a diferentes tiempos. Se extrajeron 5 mL de sangre

antes de la inyección, inmediatamente después de inyectar y 5, 15, 30, 60, 120 minutos, además a las 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. Después de separar el suero, la concentración radioactiva presente en 1 mL se midió por triplicado en el contador gamma y se determinó el % que representaba de la dosis inyectada distribuida en el volumen total de sangre del paciente (%ID/L).

Los datos de los cinco pacientes se promediaron y los parámetros farmacocinéticos se estimaron con el programa WinNonlin Professional aplicándose un modelo bicompartimental.

3.24.3 Evidencia gammagráfica de la captación tumoral del fragmento anti-CEA M3-¹³¹I en los pacientes.

Con el fin de observar la biodistribución y evaluar la captación del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I, tanto en los órganos normales como en el tumor, se tomaron imágenes gammagráficas de los pacientes a las 2, 4, 8, 24, 48 y 72 horas después de la inyección. La toma gammagráficas se realizaron en las zonas del cráneo, el tórax, el abdomen y la pelvis, con las vistas anterior y posterior de cada zona. Se empleó para ello una cámara gamma GE 400T (General Electric, EUA) con colimador de alta energía.

3.24.4 Evaluación de anticuerpos anti-fragmento en el suero de los Pacientes.

Teniendo en cuenta que existen antecedentes que demuestran la generación de anticuerpos anti-ratón durante el empleo del anticuerpo CB/iorCEA.1 en los pacientes (Oliva y col., 2005), se determinó la inmunogenicidad del fragmento anti-CEA M3 en aquellos pacientes incluidos en el ensayo clínico. Este análisis se realizó mediante un ensayo ELISA donde se evaluó la existencia de anticuerpos anti-fragmentos en el suero.

Para ello se recubrió una placa de PVC con 25 µg/mL del fragmento anti-CEA M3 diluido en PBS, y se incubó durante 4 horas a 37°C. Posteriormente, para bloquear los posible sitios activos de la placa, se adicionó PBS-leche al 3% (m/v), 200 µL por pocillo e incubando durante 1 hora a 37°C. Tanto suero negativo como las muestras de suero de los pacientes tomadas antes de la administración del radiofármaco, así como 15 días y 1 mes después de la administración, se diluyeron desde 1:50 hasta 1:64 000 (Desde 12,0 ng hasta 0,9 ng) en PBS-leche 3% (m/v) y se aplicaron en la placa por duplicado conjuntamente con una curva patrón realizada con anticuerpos policlonales de conejos anti-fragmento anti-CEA M3. Se aplicaron muestras de 100 µL por pocillo y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Luego la placa se lavó varias veces con agua-Tween 20 al 0,05% (v/v) y se aplicaron 100 µL por pocillo de conjugado proteína A-peroxidasa en una dilución de 1:80 000. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavó la placa con agua-Tween 20 al 0,05% (v/v) y se adicionaron 100 µL por pocillo de la solución de sustrato. Finalmente la reacción se detuvo con la adición de 50 µL por pocillo de solución de parada y se realizó la lectura a 492 nm en el lector de placa *LabSystems Sensident scan* (Finlandia).

Los valores obtenidos en las muestras se compararon con los de la curva patrón para determinar la cantidad de anticuerpo anti-fragmento presentes en el suero.

3.25 Métodos estadísticos empleados

Para la confirmación del carácter significativo de la diferencia estadística entre más de dos valores experimentales se utilizó la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple, seguida de pruebas de comparación múltiple tipo Dunnet, ambas contenidas en el paquete de programas *GraphPad Prism*, versión 4.00 (GraphPad Software Inc, EUA).

Los análisis correspondientes a la evaluación de la farmacocinética del fragmento anti CEA M3 marcado con ¹³¹I se realizaron utilizando el paquete de programas *WinNonlin professional* versión 2.1 (Pharsight Corporation, EUA), siguiendo la formula $C(t)=A*EXP(-\alpha*t)+B*EXP(-\beta*t)$.

4. Resultados

4.1 Clonación y Secuencia de los genes de la región variable de cadena pesada y ligera del anticuerpo CB/iorCEA.1.

A partir del ARN total del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 se logró aislar, clonar y secuenciar los genes que codifican para las regiones variables de cadena pesada y ligera. Los cebadores para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de estas regiones, se diseñaron de forma que cubriera desde el péptido señal, por el extremo 5', hasta la región CH1, por el extremo 3' de la inmunoglobulina de ratón. De estas reacciones se obtuvieron bandas de ADN con una talla molecular esperada para las regiones variables de aproximadamente 350 pb (Figura 8, líneas 3 y 4), las cuales se purificaron y se clonaron en el vector pMOS Blue para reproducirlas y secuenciarlas.

Las secuencias consensos del producto de al menos 3 PCR para ambas cadenas del anticuerpo se obtuvieron mediante secuenciación automática, correspondiendo con las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de la inmunoglobulina de ratón (Anexo 1).

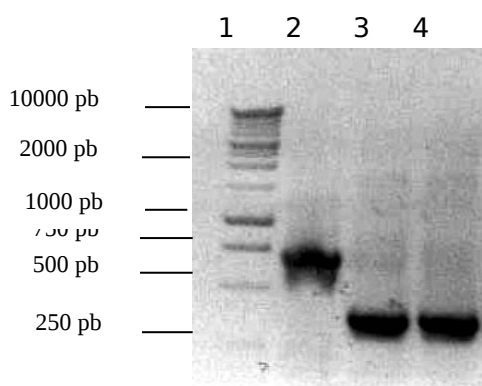


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las regiones V_H y V_L del anticuerpo CB/iorCEA1 amplificadas por PCR. Línea 1: Patrón de peso molecular, 1kb DNA ladder; Línea 2: Fragmento de simple cadena de 700pb; Línea 3: Región variable V_H del AcM CB/iorCEA1; Línea 4: Región variable V_L del AcM CB/iorCEA 1.

Una vez definidas las secuencias de las cadenas pesada y ligera de este anticuerpo, mediante la PCR, se conformó el gen que codifica para el fragmento de anticuerpo con la unión de ambas regiones variables entre sí a través de un péptido de 5 aminoácidos (Gly_4Ser), lo cual da origen a una molécula de simple cadena. El ensamblaje del gen se confirmó mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), al observarse una banda de ADN a la altura esperada de 700 pb, según el patrón de peso molecular 1 Kb ladder (Figura 8, línea 2).

Después de conformado el gen que codifica para el fragmento de anticuerpo, el mismo se clonó en el vector de expresión para *E. coli* pAcR 1, y se transformó en la cepa de *E. coli* RV 308, el ADN procedente de 8 colonias de esta transformación se purificó y se realizó un análisis de restricción con las enzimas *Nco* I y *Not* I. La talla de 700 pb del fragmento se confirmó nuevamente en un gel de agarosa al 1% (m/v). Uno de los clones positivos se seleccionó aleatoriamente para continuar con los análisis de expresión de la proteína.

4.2 Expresión y Purificación del fragmento anti-CEA.

4.2.1 Selección de los clones que expresan el fragmento anti-CEA.

Después de inducir las células de bacterias que contienen el gen del fragmento de anticuerpo, se determinó el nivel de expresión del mismo en la biomasa total mediante la densitometría. La banda correspondiente al fragmento de anticuerpo anti-CEA se identificó correctamente por el anticuerpo 9E10 que reconoce el péptido etiqueta c-myc situado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. El tamaño molecular del fragmento se estimó con el fragmento de anticuerpo (F3) como control de la talla y de la presencia del c-myc. El F3 es un fragmento de simple cadena que presenta el péptido etiqueta c-myc y tiene un peso molecular entre 27-30 kDa.

Los valores de expresión del fragmento estuvieron entre el 25-28% de las proteínas totales de las bacterias. Como puede observarse en la Figura 9A (líneas del 2 al 12), prácticamente todos los clones analizados expresaron la proteína de interés con la misma intensidad, mientras que en la cepa transformada con el vector sin el gen de interés no aparece la banda correspondiente a la proteína (Figura 9A y B, línea 13). Los clones positivos se inmunoidentificaron correctamente por *Western blotting* con el anticuerpo monoclonal 9E10 anti-c-myc (Figura 9B). Este resultado significa que los fragmentos se sintetizaron correctamente, ya que la síntesis proteica ocurre en orientación de 5' al 3' y el péptido etiqueta c-myc esta situado en el extremo carboxilo terminal de la secuencia.

Uno de los clones se seleccionó de forma aleatoria con el fin de aumentar el volumen de fermentación y efectuar la extracción y purificación del fragmento.

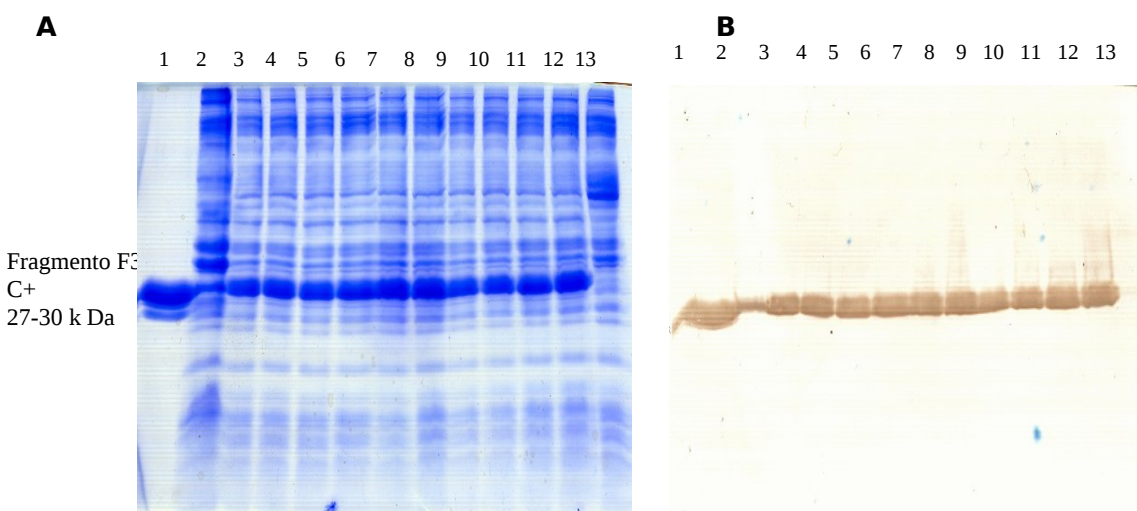


Figura 9: Análisis de la expresión del fragmento anti-CEA en el vector pAcR.1. A: Gel de poliacrilamida en presencia de SDS al 15% teñido con *Coomassie blue*; **B:** *Western blotting* con el anticuerpo monoclonal 9E10 anti c-myc. Línea 1: Control positivo (fragmento F3 puro); Líneas del 2 al 12: Colonias analizadas; Línea 13: Cepa RV 308 sin transformar.

4.2.2 Purificación por IMAC del fragmento anti-CEA presente en el sobrenadante de ruptura.

Después de escalar el cultivo hasta 1 L con el clon seleccionado, el fragmento anti-CEA se purificó a partir de las proteínas solubles extraídas en el sobrenadante de ruptura. La purificación por IMAC se realizó en una matriz de Ni-NTA con la ayuda que proporciona la presencia de las 6 histidinas en el extremo carboxiloterminales de la proteína.

La Figura 10 muestra los resultados obtenidos durante todo el proceso de purificación por IMAC

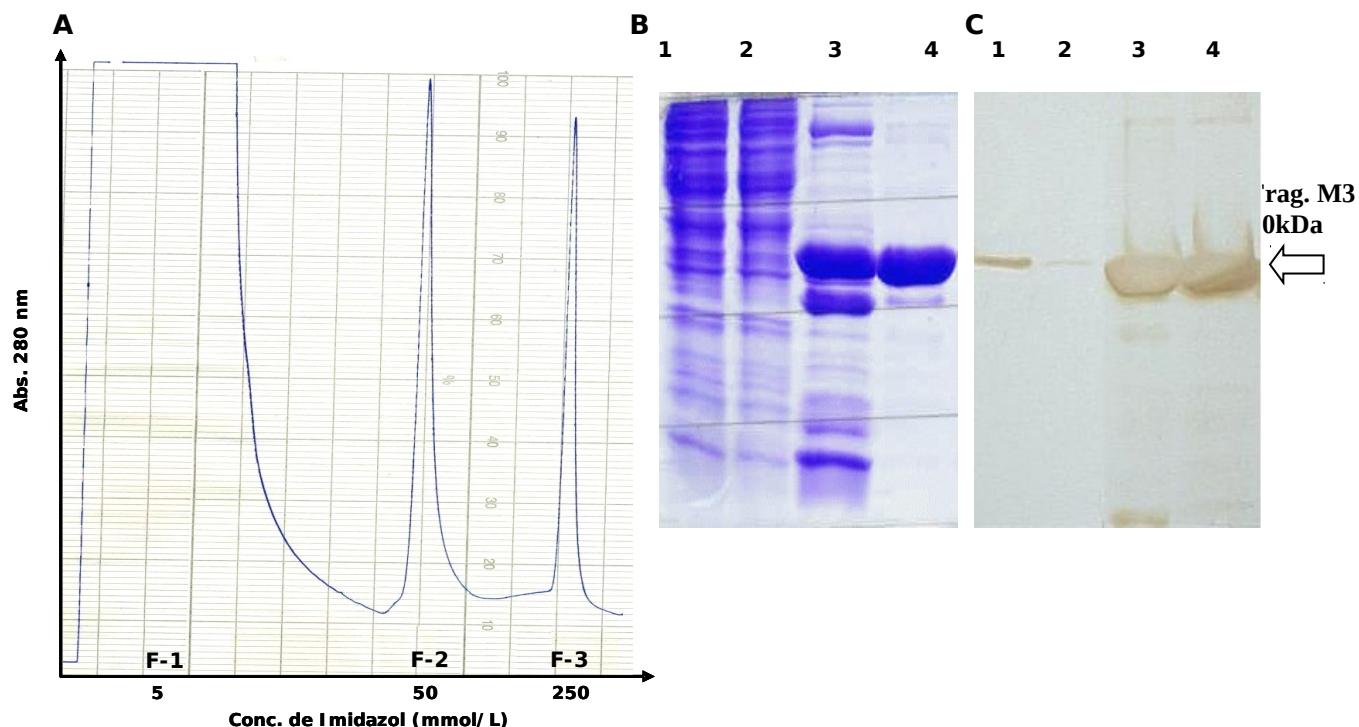


Figura 10: Purificación del Fragmento anti-CEA por IMAC. A: Perfil cromatográfico, F-1: Fracción no unida a la matriz (5 mmol/L de imidazol). F-2: Lavado con 50 mmol/L de imidazol. F-3: Proteínas eluidas con 250 mmol/L de imidazol; B: Electroforesis de acrilamida al 15%; C: *Western blotting* revelado con AcM anti-cmyc 9E10. Línea 1: Proteínas totales, Línea 2: Proteínas no unidas a la matriz, Línea 3: Lavado, Línea 4: Elución.

En la Figura 10A se observa el perfil cromatográfico de la purificación con las tres fracciones que eluyen de la columna según la concentración de imidazol usada en cada paso. En la Figura 10B se presenta la electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 15% (v/v) en condiciones desnaturizantes de cada una de las fracciones. Como se observa en la fracción no unida a la matriz y en la fracción de lavado existe una banda de proteína a la talla esperada del fragmento, en la fracción de elución se destaca una banda de proteína caracterizada por un elevado grado de pureza.

En la Figura 10C se exhiben los resultados de la inmunoidentificación del fragmento anti-CEA por *Western blotting* con el AcM 9E10 anti-cmyc. Como se puede observar en la fracción que no queda atrapada a la matriz aparece una banda de proteína correspondiente al fragmento de anticuerpo, es posiblemente que esto sea debido a la saturación de la matriz o a la exposición

incorrecta de las histidinas en algunas moléculas. En el siguiente paso de la purificación, durante el lavado con 50 mmol/L de imidazol, también se identifica una banda de proteína correspondiente al fragmento de anticuerpo, motivada posiblemente por el desprendimiento de la matriz de una porción de los fragmentos que estaban débilmente unidos al Ni-NTA. En la fracción de elución solo se identifica una banda, indicativo de que durante la purificación no ocurren degradaciones de la proteína.

4.2.3 Segunda Etapa de purificación por cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, realizada como segunda etapa de purificación (Figura 11), permitió separar dos conformaciones moleculares del fragmento de anticuerpo que estaban formando parte de la fracción de elución en IMAC y que no se habían observado durante la electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, este paso de purificación además, contribuye a la eliminación del imidazol presente en la fracción eluida del IMAC.

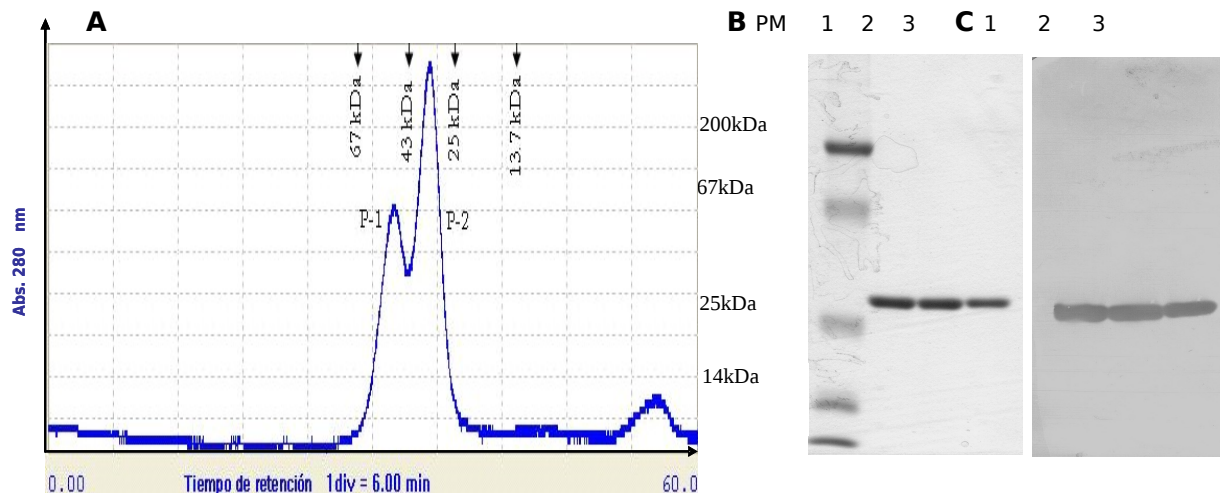


Figura 11: **A:** Perfil cromatográfico a la absorbancia de 280 nm de la cromatografía de exclusión molecular en HPLC con una columna analítica XK-10/30 y la matriz Superdex 200 calibrada con un patrón de peso molecular que contiene: ribonucleasa A (13,7 kDa); quimiotripsinógeno A (25 kDa); ovalbúmina (43 kDa); albúmina (67 kDa). Se aplicaron entre 150 y 200 μ L del fragmento eluido de la purificación por IMAC. **B:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS al 15% y teñido con *Coomssie blue*. **C:** *Western Blotting* con el anticuerpo 9E10 anti-c-myc. PM: Patrón de peso molecular, Línea 1: Pico 1 de la gel filtración, Línea 2: Pico 2 de la gel filtración, Línea 3: F3, Control Positivo.

En el perfil cromatográfico de esta corrida se observan dos picos muy bien definidos tal y como se presenta en la Figura 11A, el pico 1 eluyó en un tiempo de retención de 31,84 minutos, 3,44 minutos después que la Albúmina (PM de 67 kDa) y 1,44 minutos antes que la Ovalbúmina (PM de 43 kDa), lo que corresponde con el peso molecular teórico para un fragmento con conformación dimérica que se encuentra entre 55 y 60 kDa (está es la fracción de interés y en lo adelante se denominara fragmento anti-CEA M3). Como se exhibe en el cromatograma el pico 2 eluyó 3,37 minutos después del pico 1 con un tiempo de retención de 35,21 minutos, entre la Ovalbúmina y el quimiotripsinógeno A (PM de 43 y 25 kDa respectivamente), lo que corresponde en este caso con el peso molecular teórico para un fragmento con conformación monomérica, de

entre 25 y 30 kDa. En el análisis del área bajo la curva de ambos picos se estimó que la proporción entre ellos es de aproximadamente 2:1 y es el pico 2 el de la mayor cantidad de moléculas eluidas.

Durante el estudio de ambos picos por electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes se puede observar una elevada pureza de ambas fracciones. Con estas condiciones de corrida las proteínas de ambos picos migran en la misma talla molecular de aproximadamente 27-30 kDa (Figura 11B). En el *Western blotting* se observó la inmunoidentificación, con el AcM 9E10 anti-cmyc, de los dos Picos eluidos y del fragmento de anticuerpo F3 (usado como control positivo del ensayo) (Figura 11C).

4.3 Efecto del pH y la concentración de NaCl en la relación entre los picos 1 y 2.

En la Tabla 3 se presentan los tiempos de retención y los porcentajes obtenidos para las fracciones de proteína 1 y 2 que eluyen de la cromatografía en gel filtración del fragmento anti-CEA, al variar el pH y la concentración de NaCl.

Tabla 3: Efecto del pH y la concentración de NaCl sobre la proporción entre pico1-pico 2 durante el proceso de purificación del fragmento anti-CEA M3. Se señala el tiempo de retención y los porcentajes de cada fracción, calculados según el área bajo la curva.

300 mmol/L de NaCl		
pH	Pico 1	Pico 2
7.0	33,37 min, 29,9 %	36,79 min, 57,9 %
7.5	33,53 min, 32,9 %	37,17 min, 66,8 %
8.0	33,11 min, 42,2 %	36,76 min, 54,8 %
150 mmol/L de NaCl		
7.0	33,11 min, 33,8 %	36,59 min, 63 %
7.5	32,96 min, 23,9 %	36,36 min, 36 %
8.0	32,72 min, 40,8 %	36,16 min, 51,5 %
100 mmol/L de NaCl		
7.0	40,52 min, 82,08 %	50,88 min, 0,86 %
7.5	38,45 min, 28,0 %	40,63 min, 48,97 %
8.0	38,15 min, 70,25 %	-
Tampón para gel filtración (50 mmol/L NaH ₂ PO ₄ ; 300 mmol/L NaCl) Control +		
7.8	31,97 min, 27,08 %	35,68 min, 33,21 %

El resultado de estas variaciones se compara además, con las proporciones de los picos obtenidas usando el tampón descrito en el acápite 4.2. En la Figura 12 solo se presentan los cromatogramas correspondientes al pH 8 por ser el de mayor rendimiento de pico 1.

Al elevar el pH hasta 8 se obtiene un ligero incremento de la fracción de interés hasta 42,2 y 40,8% de pico 1 tanto a 300 como a 150 mmol/L de NaCl respectivamente. El tiempo de retención así como las proporciones entre los picos 1 y 2 no reflejaron grandes variaciones con el pH ni tampoco al reducir la concentración salina hasta 150 mmol/L, en ambos casos el tiempo de retención se mantuvo entre los 33 y 37 minutos respectivamente (Tabla 3, Figuras 12A y B).

Al disminuir la concentración de NaCl hasta 100 mmol/L se produce un aumento del tiempo de retención en los dos picos a cualquiera de los pH estudiados (Tabla 3), específicamente a pH 8 se observó la elución de un solo pico con un tiempo de retención de 38 minutos (Figura 12C), el pico 3 que aparece en las graficas correspondió a otros componentes del tampón de elución del IMAC, como el imidazol.

En la Figura 12D, se puede apreciar que al realizar la comparación con las condiciones previas de purificación, las proporciones entre los picos 1 y 2 son bastante conservadas. Las cantidades de pico 2, siempre fueron superiores a las del pico 1.

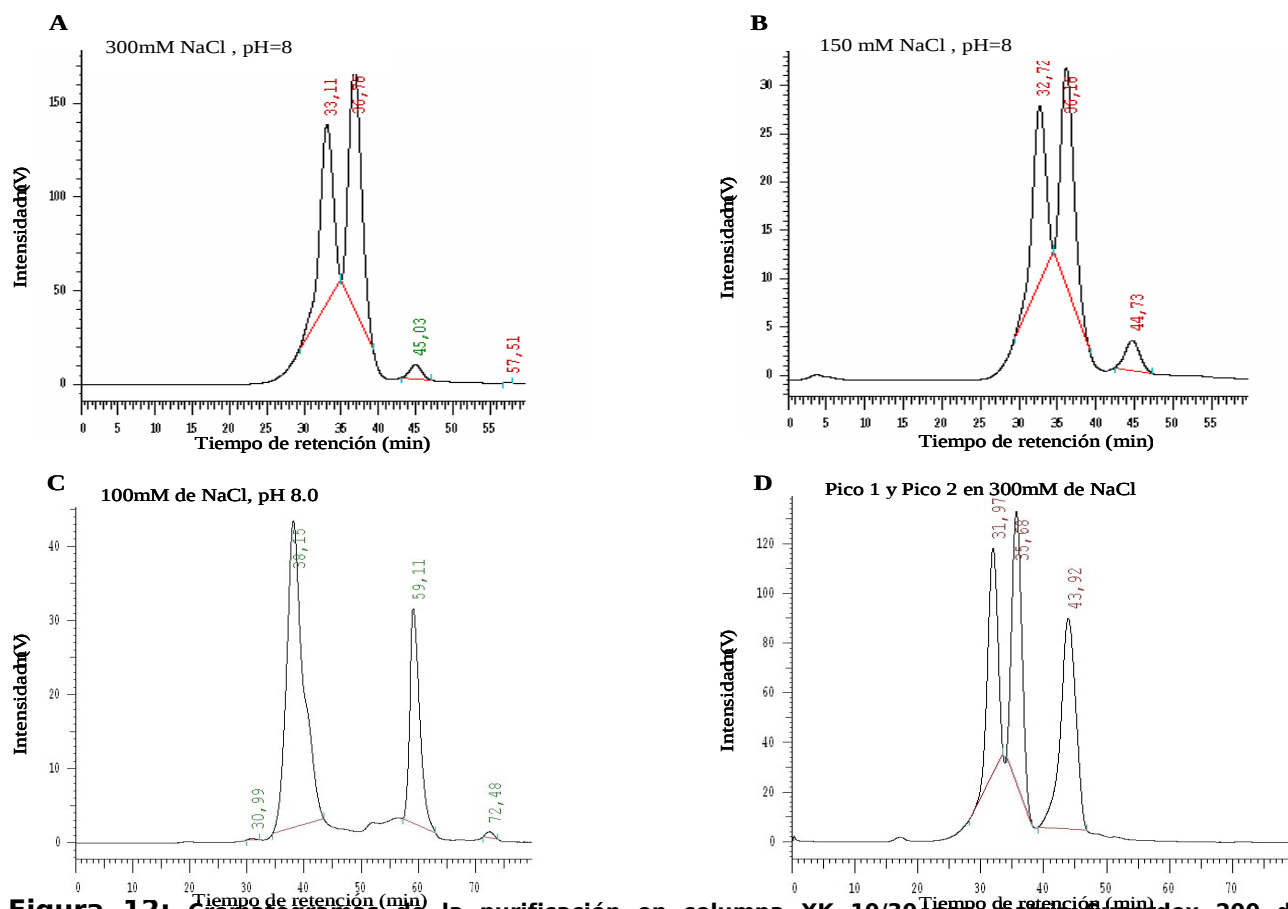


Figura 12: Cromatogramas de la purificación en columna XK 10/30 con matriz Superdex 200 del fragmento anti-CEA, obtenidos a una absorbancia de 280 nm. A: extraídos en concentraciones de 300 mmol/L de NaCl; B: extraídos en concentraciones de 150 mmol/L de NaCl; C: extraídos en concentraciones de 100 mmol/L de NaCl a pH 8; D: Muestra control, perfil de elución del fragmento en tampón de gel filtración. Se aplicaron 250 μ L de cada muestra.

En otros experimentos realizados con el objetivo de estudiar la estabilidad de estas conformaciones, al desnaturalizar el pico 2 con urea 6 mmol/L pH 7.8 el tiempo de retención en gel filtración de esta fracción se incrementa significativamente sugiriendo un tamaño molecular superior al dímero, sin embargo, luego de renaturalizar nuevamente la proteína, mediante diálisis en el tampón para gel filtración, se pudo observar nuevamente la formación de los picos 1 y 2 en las mismas proporciones ya descritas (resultados no mostrados).

4.4 Reconocimiento del fragmento anti-CEA M3 al CEA Humano.

Una vez purificado el fragmento anti-CEA M3 y con el fin de estudiar el reconocimiento específico al antígeno, se realizó un ensayo tipo ELISA donde se incubó el fragmento de anticuerpo con el CEA y con la BSA.

Como puede apreciarse en la Figura 13 el fragmento anti-CEA M3 al igual que el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 reconocieron específicamente al CEA humano.

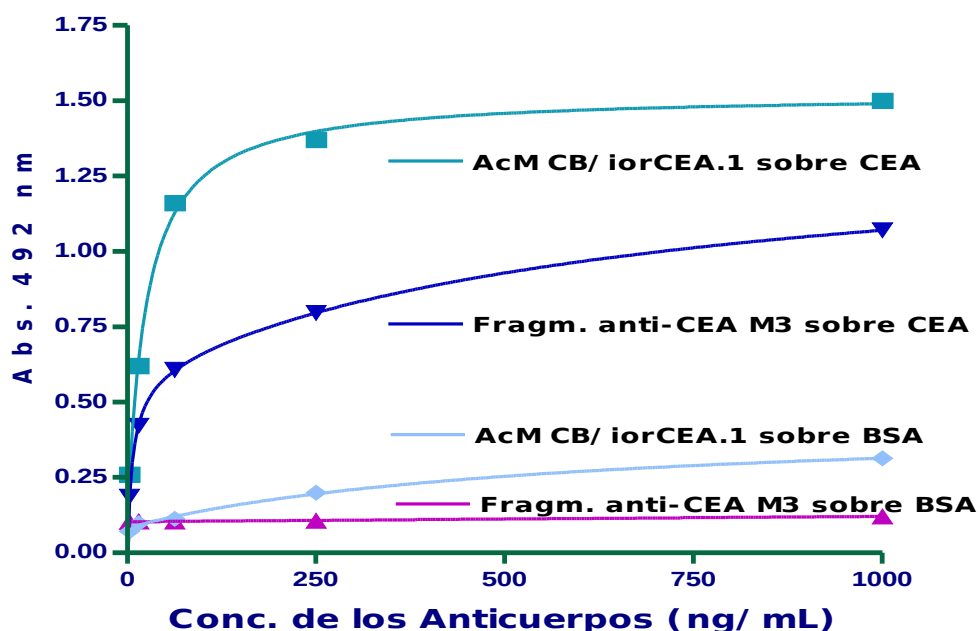


Figura 13: ELISA de reconocimiento específico del Fragmento anti-CEA al antígeno CEA humano. ELISA realizado en una placa recubierta con concentraciones fijas de 2 μg /pozo de CEA humano y 1 μg /pozo de BSA respectivamente. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1. Se realizaron diluciones de los anticuerpos desde 10 hasta 1 000 ng/mL en PBS-leche al 2% (m/v). Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo policlonal anti Fab del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 obtenido en conejo, usándose a una concentración de 10 μg /mL. Posteriormente se utilizó un conjugado anti-IgG de conejo unido a peroxidasa diluido 1:5 000, y como cromógeno OPD.

El mayor valor de absorbancia a 492 nm obtenido para el anticuerpo fue de 1,50 alcanzándose con una concentración de anticuerpo de 1 μg /mL. Para el fragmento anti-CEA M3 a esta misma concentración la absorbancia fue de 1,0. Los valores de ambas moléculas contra BSA (usada como proteína no relacionada), se mantuvieron inferiores a 0,25 de absorbancia en todas las concentraciones, y fue similar al fondo del ensayo.

4.5 Determinación de la constante de Afinidad del fragmento anti-CEA M3.

La constante de afinidad del fragmento anti-CEA M3 se determinó mediante dos métodos. (1) Un ensayo ELISA no competitivo, en el cual se estimaron los valores de afinidad tanto para el fragmento como para el anticuerpo CB/iorCEA.1. El cálculo de estos parámetros demostró que el fragmento posee una K_A de $2,8 \pm 0,3 \times 10^{10} (\text{mol/L})^{-1}$, mientras que para el AcM CB/ior-CEA.1 el valor de K_A fue de $6,1 \pm 0,5 \times 10^{10} (\text{mol/L})^{-1}$.

La determinación de la afinidad realizada en el (2) BIAcore (Pharmacia, Suecia) después de inmovilizar la molécula de fragmento sobre un sensor recubierto de ácido nitriloacético y níquel, con el empleo de las colas de histidinas, demostró que el fragmento anti-CEA M3 presenta una K_A de $3,71 \times 10^9$ (mol/L)⁻¹. Por este método no fue posible estudiar la afinidad del anticuerpo completo ya que no posee la cola de histidinas mediante la cual se inmoviliza la molécula sobre el sensor.

4.6 Ensayo de Inmunofluorescencia del fragmento anti-CEA M3 sobre células LS 174T.

Con el objetivo de estudiar la especificidad del fragmento anti-CEA M3 al antígeno expresado en la membrana celular, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia sobre las células humanas LS 174T que expresan el CEA en membrana. Se demostró que el CEA es reconocido específicamente por el fragmento anti-CEA M3 de manera similar a como lo hace el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 (Figuras 14A y B). En las figuras se observa la inmunofluorescencia en la membrana alrededor de toda la célula. Desde el punto de vista cualitativo tanto el fragmento de anticuerpo como el AcM CB/iorCEA.1 tuvieron una evaluación de tres cruces en cuanto a la intensidad del marcaje. En las células incubadas con un anticuerpo no relacionado no se observó fluorescencia (Figura 14C).

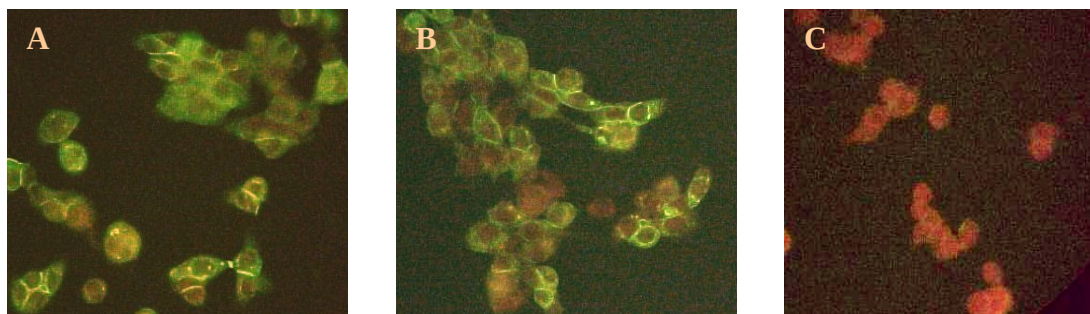


Figura 14: Inmunofluorescencia sobre células humanas LS 174T. A: Anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1. **B:** Fragmento anti-CEA M3. **C:** Control negativo (Anticuerpo T1 no relacionado). El ensayo se realizó mediante la incubación de las células con 20 μ L del fragmento anti-CEA M3 a una concentración de 2,5 μ g/mL y 20 μ L del anticuerpo monoclonal que se encontraba a una concentración de 10 μ g/mL, después de la incubación y como segundo anticuerpo se utilizó el anticuerpo policlonal anti-fragmento M3 generado en conejo. Seguidamente las células se incubaron con el conjugado anti-conejo FITC.

4.7 Reconocimiento del fragmento anti-CEA M3 sobre las células LS 174T por Citometría de flujo (FACS).

El porcentaje de las células LS 174T que expresan el antígeno y que son reconocidas por el fragmento anti-CEA M3 y el anticuerpo completo se analizaron en un ensayo de citometría de flujo (FACS).

Como se observa en la Figura 15 el fragmento anti-CEA M3 (pico 1) reconoce el 75,2% de las células LS 174T presentes en la preparación y que expresan el CEA en membrana, mientras que el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 reconoce el CEA expresado en el 72,7% de las células. En el caso del pico 2 del gel filtración, también reconoció al antígeno en un 75,2% de las células, resultado no esperado y que originó una serie de experimentos con el fin de estudiar con mayor

detalle las conformaciones del fragmento anti-CEA que se separan durante la cromatografía de exclusión molecular.

Las células incubadas solamente con el anticuerpo policlonal anti-fragmento tuvieron un fondo de marcaje de el 12,5%, valor que fue sustraído al realizar el análisis con las moléculas de interés.

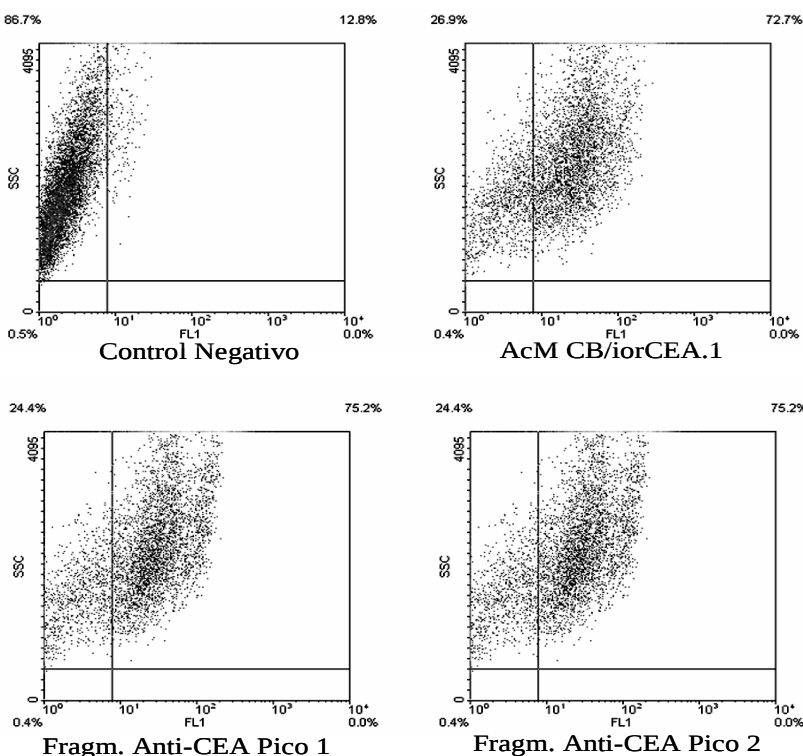


Figura 15: Representación gráfica por densidad de la Citometría de flujo con células LS 174T para el fragmento anti-CEA M3 y el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1.

La citometría de flujo se realizó con el empleo de 3×10^6 células LS 174T para cada muestra, 5 $\mu\text{g/mL}$ de fragmento y 10 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo completo se incubaron con las células en un volumen de 250 μL , posteriormente se incubaron con 30 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo policlonal anti-fragmento anti-CEA. Concluidos los lavados las células se incubaron con el conjugado anti-conejo FITC diluido 1:100. Un total de 20 000 células en cada muestra se analizaron en el citómetro de flujo.

4.8 Estudio de la estructura del fragmento anti-CEA.

Con el objetivo de estudiar con mayor detalle las conformaciones de los fragmentos anti-CEA que se obtienen durante la cromatografía de exclusión molecular (pico 1 y 2), y buscar elementos que permitan explicar la actividad biológica de un fragmento de simple cadena conformado con un péptido de unión de 5 aminoácidos, se realizaron varios experimentos donde se compararon estos fragmentos con el fragmento L15 de conformación monomérica.

4.8.1 Clonaje y Expresión de un fragmento de simple cadena conformado con un péptido de unión de 15 aminoácidos.

En la Figura 16 se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (v/v) desnaturalizante y la inmunoidentificación en *Western blotting* de la purificación del fragmento L15 por IMAC. Como se observa en la electroforesis (Figura 16A), el fragmento L15 se purificó usando la matriz Ni-NTA y siguiendo el mismo procedimiento descrito para el fragmento anti-CEA, en este tipo de electroforesis los dos fragmentos migran en a una talla molecular esperada de aproximadamente 25 a 30 kDa como moléculas monomérica (Líneas 4 y 5). La pureza con la cual eluyó el fragmento L15 del IMAC estuvo cerca del 90% y fue inmunoidentificado correctamente en *Western blotting* con el anticuerpo policlonal anti-fragmento M3, Figura 16B,

Línea 2, en la figura también se observa la inmunoidentificación del fragmento anti-CEA M3 (Línea 1).

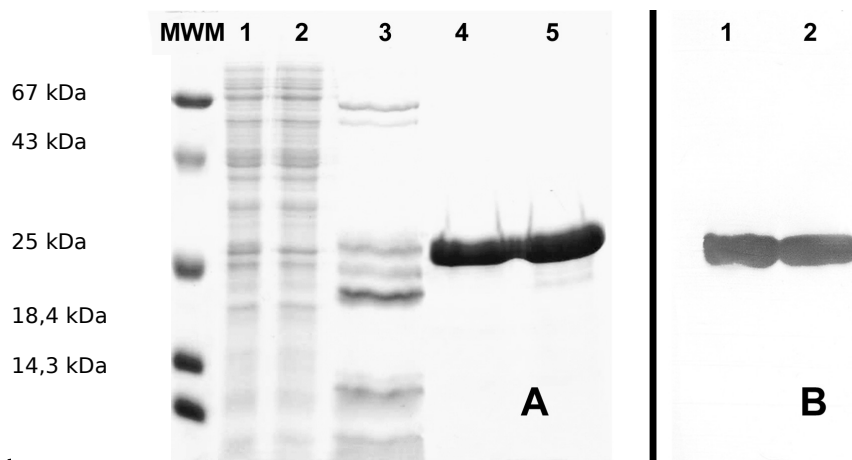


Figura : Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de la purificación por IMAC de los sobrenadantes de ruptura de los fragmentos anti-CEA (se incluye el fragmento L15). MWM (*molecular weight markers*): lisozima, 14,3 kDa; b-lactoglobulina, 18,4 kDa; chimotripsinogeno A, 25 kDa; ovalbúmina, 43 kDa; albúmina, 67 kDa Líneas 1-3: Un ejemplo representativo de la purificación de ambas construcciones: Línea 1: Proteínas totales del sobrenadante de ruptura; Línea 2: Proteínas no unidas a la matriz; Línea 3: Proteínas del lavado; Línea 4: Proteínas del fragmento M3 y Línea 5: Proteínas del fragmento L15 eluidas de la matriz con 250 mmol/L de imidazol. **B: Western blotting de las proteínas eluidas, con el anticuerpo policlonal anti-M3 obtenido en conejo.** Línea 1: Proteínas de la elución del fragmento M3; Línea 2: Proteínas de la elución del fragmento L15.

4.8.2 Cromatografía en gel filtración de los fragmentos anti-CEA y L15.

Los perfiles cromatográficos de las purificaciones de los fragmentos anti-CEA y L15 en la matriz Superdex 200 se muestran en la Figura 17. Como se observa en la cromatografía el fragmento L15 (Pico 3) eluyó a un tiempo de retención de 34,30 minutos, en correspondencia a una molécula con un peso molecular entre 25-30 kDa de acuerdo a la calibración de la columna, mientras que los picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA eluyeron con tiempos de retención de 30,20 (55-60 kDa) y 32,78 (30 kDa) respectivamente. En el cromatograma del fragmento L15 se observa además un pequeño pico que eluyó por delante del Pico 3, el cual corresponde a la fracción dimérica de este fragmento.

El aumento del tiempo de retención del fragmento L15 con relación al pico 2 del anti-CEA puede deberse a un mayor empaquetamiento de la molécula, lo que provoca una ligera disminución

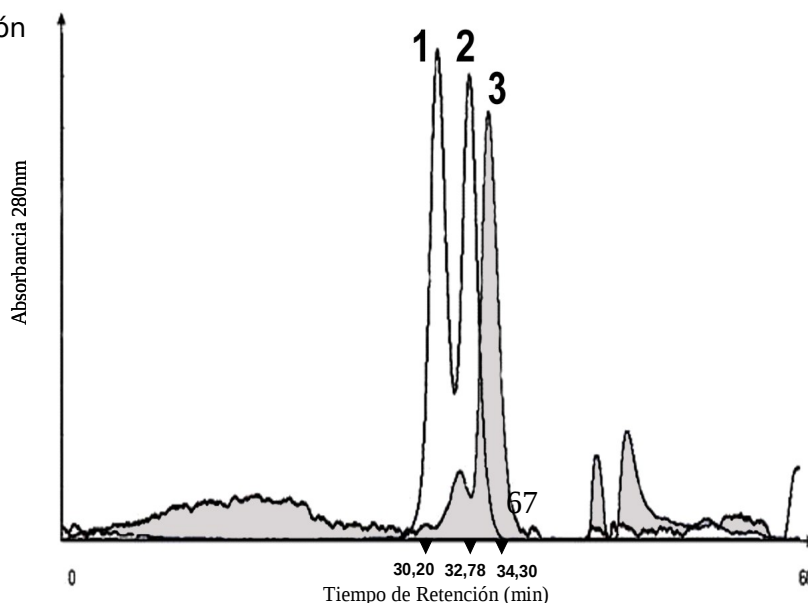


Figura 17: Cromatogramas de la purificación de los picos del fragmento M3 y L15 mediante cromatografía de exclusión molecular en Superdex 200. Los picos 1 y 2 corresponden al fragmento anti-CEA, ambos picos puros se mezclaron para la corrida, el pico 3 corresponde al fragmento anti-CEA L15 y se corre en la cromatografía de forma independiente. Los perfiles cromatograficos de cada uno se superponen para su comparación.

4.8.3 Determinación del Coeficiente de Absortividad específica de los fragmentos anti-CEA y L15.

Con el proposito de estudiar y comparar los fragmentos, se realizó la determinación del coeficiente de absortividad específica. Los picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA (Figura 17) dieron valores promedios de $0,9289 \pm 0,0343 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $1,0359 \pm 0,0296 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ respectivamente, mientras que el coeficiente de absortividad específica (a_s) para el fragmento L15 (pico 3, Figura 17) fue de $1,0993 \pm 0,0942 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Teniendo en cuenta que el peso molecular teórico para el pico 1 es de 55854 Da, la constante de absortividad molar para esta conformación tuvo un valor de $51892 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mientras que para los picos 2 y 3 la constante de absortividad molar fue parecida con un valor de $30147 \text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Estos resultados sugieren que los picos 1 y 2 son estructuralmente diferentes entre ellos y que el pico 2 del fragmento anti-CEA es más semejante al fragmento L15 que al pico 1.

4.8.4 Estimación de la talla molecular de los fragmentos anti-CEA y L15 mediante difracción dinámica de luz.

Los resultados obtenidos en los análisis mediante difracción dinámica de luz a las moléculas presentes en los picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA y del pico 3 del fragmento L15 (Figura 17) se presentan en la Tabla 4. Los picos 2 y 3 exhibieron valores de distribución de partículas y de peso molecular relativo de 65 y 63 kDa respectivamente, mientras que el valor obtenido para el pico 1 fue de 107 kDa.

Las tallas moleculares obtenidas por este método duplican los estimados registrados en gel filtración, no obstante los fragmentos presentes en los picos 2 y 3 vuelven a ser más parecidos entre sí que con el pico 1.

Tabla 4: Promedios de los valores de distribución en dependencia de las tallas de las moléculas presentes en las preparaciones de los Picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA M3 y del Pico 3 del fragmento L15.

Muestras	R (nm)	MW-R (kDa)	% Int	% Mass
Pico-1	4,4	107	100	100
Pico-2	3,6	65	100	100
Pico -3 (L15)	3,5	63	100	100

4.9 Escalado de la producción del fragmento hasta 5 litros de Fermentación.

En cada una de las fermentaciones de 5 litros realizadas con la cepa de bacteria RV 308 transformada con el gen del fragmento anti-CEA M3 (12 fermentaciones), se obtuvo un promedio de 100 gr de biomasa húmeda por fermentación.

La ruptura de esta cantidad de biomasa en la prensa de French permitió la recuperación de más de 8 gr de proteínas totales en el sobrenadante de ruptura, el cual fue posteriormente purificado por IMAC y gel filtración.

La Tabla 5 presenta los resultados obtenidos en 2 procesos de purificación realizados por IMAC a partir de 100 gr de biomasa (1 Fermentación), donde se evaluaron las concentraciones de 50 y 25 mmol/L de imidazol durante el paso de lavado.

Como puede observarse, al disminuir la concentración del imidazol en el tampón de lavado se logró aumentar los rendimientos en la elución final del IMAC desde 3,02 hasta 10,07 mg de fragmento por litro de cultivo no obstante comenzar la purificación con 25 mL menos de material inicial. La cantidad total de fragmento anti-CEA producida en cada proceso fueron de 15,14 y 50,35 mg totales respectivamente, sin alterarse el porcentaje de pureza del producto final.

Tabla 5. Análisis de los rendimientos del fragmento anti-CEA M3 en IMAC con lavados a 50 y 25 mmol/L de Imidazol a partir de la biomasa de 5 L de fermentación.

Lavado con 50 mmol/L de Imidazol					
A partir de 100g de biomasa (5l de cultivo).	Volumen de muestra (ml)	Conc. (mg/ml)	Proteínas Totales (mg)	Pureza (%)*	Total de fragmentos (mg)
Muestra inicial	450	18,25	8212,5	4,74	N/D
Fracción no unida a la matriz	600	12,95	7770	N/D	N/D
Lavado	60	1,28	76,8	51,48	39,54
Elución	15	1,04	15,6	97,05	15,14
Rendimiento = 3,02 mg de fragmentos/L de cultivo.					
Lavado con 25 mmol/L de Imidazol					
Muestra inicial	425	20,08	8534	4,74	N/D
Fracción no unida a la matriz	525	14,66	7696,5	N/D	N/D

Lavado	41	0,52	21,32	18,66	3,98
Elución	18	2,82	50,76	99,2	50,35
Rendimiento = 10,07 mg de fragmentos/L de cultivo.					

N/D: No determinado

*El porcentaje de pureza se estimó por densitometría.

En la Figura 18 se presentan los resultados obtenidos en la cromatografía por IMAC donde se empleó 25 mmol/L de imidazol en el lavado, así como los análisis de pureza en geles de poliacrilamida al 15% e inmunoidentificación por *Western Blotting*. Como puede apreciarse en el perfil cromatográfico (Figura 18A) de la columna eluyen tres fracciones en dependencia de la concentración de imidazol usada en cada paso.

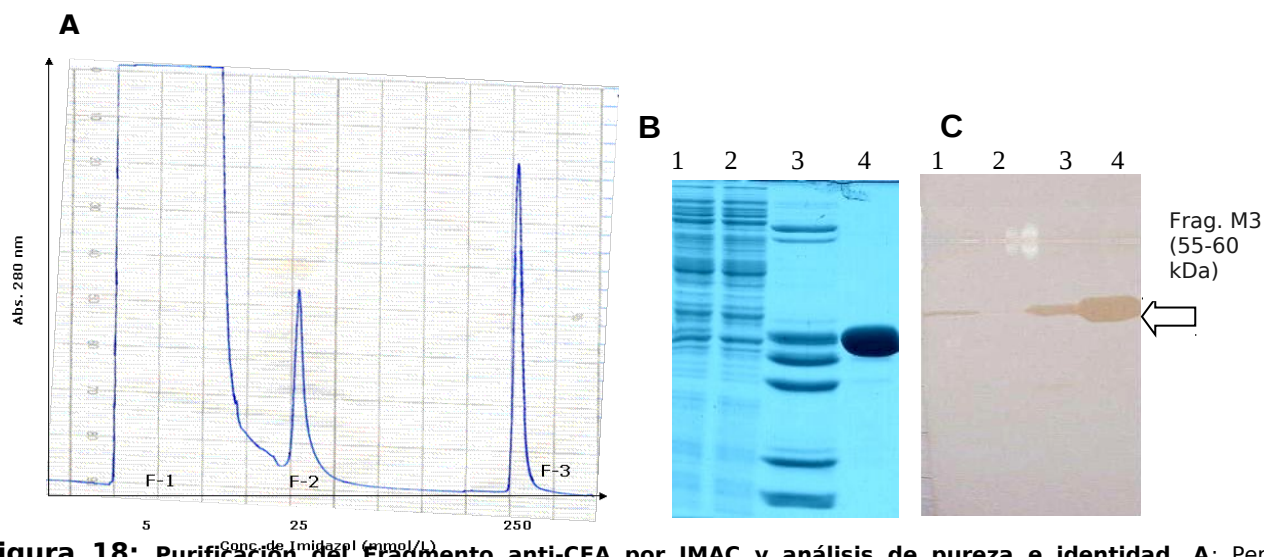


Figura 18: Purificación del Fragmento anti-CEA por IMAC y análisis de pureza e identidad. **A:** Perfil cromatográfico, F-1, fracción no unida a la matriz (5 mmol/L de imidazol). F-2, lavado con 25 mmol/L de imidazol. F-3, proteínas eluidas con 250 mmol/L de imidazol; **B:** Electroforesis de acrilamida al 15% (v/v), **C:** *Western blotting* con anticuerpo policlonal anti-fragmento M3, Línea 1: Proteínas totales, Línea 2: Proteínas no unidas a la matriz, Línea 3: Lavado, Línea 4: Elución (se aplicaron 10 µg totales de proteína en cada muestra).

En la electroforesis de poliacrilamida al 15% (v/v) en condiciones desnaturalizantes (Figura 18B) se pueden apreciar la presencia de la proteína de interés en el material inicial de entrada a la columna (Línea 1), la ausencia de esta banda en la fracción no unida a la matriz (Línea 2), lo cual significa que todos los fragmentos presentes en el material inicial quedaron acoplados a la misma, las bandas de proteínas eluidas con el tampón de lavado (Línea 3) y la única banda que eluye con el tampón de elución (Línea 4).

Durante la inmunoidentificación de las proteínas en *Western blotting* con el anticuerpo policlonal anti-fragmento M3 (Figura 18C), se observa el reconocimiento de los fragmentos presentes en la fracción soluble del sobrenadante de ruptura aplicada en la columna (Línea 1), se confirma que no existen fragmentos en la fracción no unida a la matriz (Línea 2), y se observa que durante el lavado con 25 mmol/L de imidazol continúan eluyendo fragmentos anti-CEA acoplados débilmente a la matriz (Línea 3), en este caso la cantidad observada es mucho menor al comparar con los lavados de procesos anteriores donde se utilizó una concentración de 50 mmol/L de imidazol. La banda correspondiente al fragmento anti-CEA presentes en la fracción de

elución muestra un alto porcentaje de pureza (Línea 4) no obstante haber disminuido la cantidad de imidazol durante el paso de lavado.

En el análisis por densitometría de las fracciones de lavado y elución de la purificación por IMAC se puede observar que al emplear 25 mmol/L en el tampón de lavado el 18,66% de las proteínas presentes en esta fracción corresponden al fragmento de anticuerpo (Figura 19A). En la fracción de elución usando 250 mmol/L el fragmento anti-CEA constituyó el 97% de las proteínas presentes (Figura 19B).

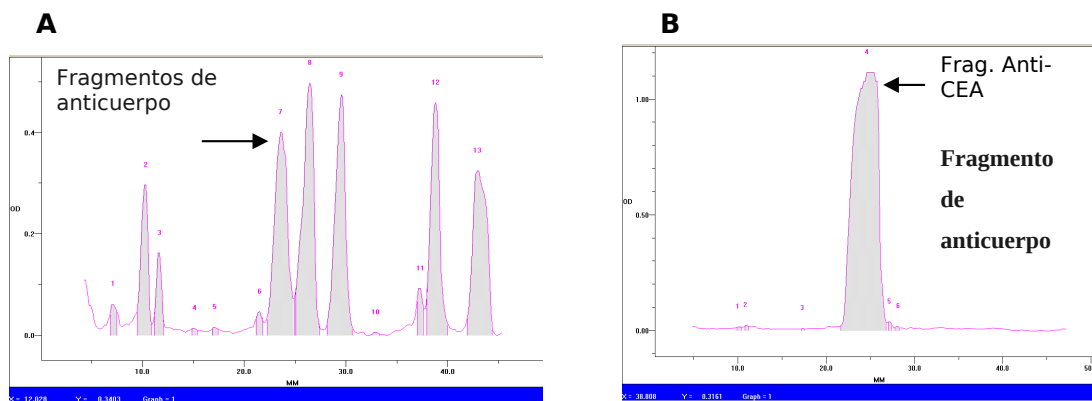


Figura 19: Densitometría de la purificación del fragmento por IMAC. **A:** Corresponde a la fracción F-2 del cromatograma (fracción de lavado); **B:** Corresponde a la fracción F-3 del cromatograma (fracción de elución).

En la Figura 20 se muestra la cromatografía de exclusión molecular en una columna semipreparativa con matriz Superdex 200 realizada a la fracción del fragmento anti-CEA del IMAC eluida con 250 mmol/L de imidazol. En los resultados que se presentan se puede apreciar la existencia de los dos picos que ya se habían observado durante las purificaciones usando una columna analítica. Los tiempos de retención para los picos 1 y 2 en estas condiciones son 63 y 70 minutos correspondiendo nuevamente a estimados de peso molecular para dímeros y monómeros como ya se describió anteriormente.

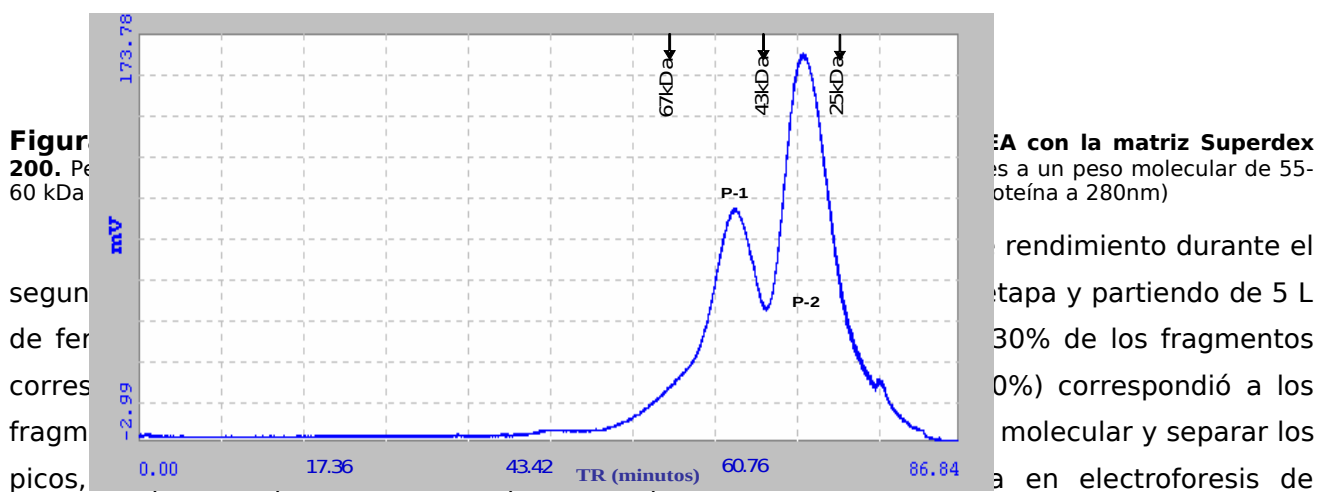


Figura 20. Purificación del fragmento anti-CEA con la matriz Superdex 200. Pico 1 a un peso molecular de 55-60 kDa

según el análisis de densitometría de los fragmentos de anticuerpo, correspondientes a los picos 1 y 2.

El fragmento anti-CEA con la matriz Superdex 200 se purificó a un peso molecular de 55-60 kDa (Figura 20).

El rendimiento durante el proceso de purificación por cromatografía de exclusión molecular y partiendo de 5 L de solución de anticuerpo, el 30% de los fragmentos de anticuerpo (100%) correspondió a los fragmentos de anticuerpo de peso molecular y separar los fragmentos de anticuerpo en electroforesis de exclusión molecular.

Los fragmentos de anticuerpo de peso molecular de 55-60 kDa se purificaron en electroforesis de exclusión molecular y se analizaron por densitometría y gel filtración analítica y ambos se inmunoidentificaron mediante *Western blotting* con el anticuerpo policlonal anti-fragmento M3 (resultados no mostrados).

mostrados). El rendimiento final promedio alcanzado de 3 procesos se calculó en $3,18 \pm 0,25$ mg/L de cultivo de fragmentos de anticuerpo del Pico 1 el cual corresponde a la fracción dimérica y es el fragmento anti-CEA M3.

Tabla 6: Análisis de rendimiento del Fragmento anti-CEA en la cromatografía de Gel Filtración.

A partir de 100 g de biomasa (5L de cultivo).	Promedio de Concentración (mg/ml)	Pureza (%)	Total de fragmentos Producidos (mg)
Elución de IMAC	$3,05 \pm 0,32$	97,2	50,35
Primera fracción (Pico 1)	$0,44 \pm 0,05$	99,80	15,90
Segunda fracción (Pico 2)	$0,85 \pm 0,08$	99,03	35,24

Recobrado: Pico 1=30%, Pico 2 = 70%.
Rendimiento = $3,18 \pm 0,25$ mg de fragmentos diméricos/L de cultivo.

Partiendo de esta escala de fermentación (5L) se logró reproducibilidad en la extracción y purificación del fragmento anti-CEA M3, lo que permitió diseñar un proceso productivo para la obtención de las cantidades necesarias en los estudios de formulación, estabilidad, toxicología y ensayo clínico. El diagrama de flujo del proceso productivo se muestra en los Anexos (Anexo 2).

4.10 Estudio de Formulación y de Estabilidad del fragmento anti-CEA M3.

4.10.1 Formulación del fragmento anti-CEA M3.

Los estudios de formulación del fragmento anti-CEA M3 realizados sin NaCl demostraron que el fragmento pierde la estabilidad y la actividad biológica al estar expuesto durante 5 días a una temperatura de 45°C en esta solución. En todas las muestras se observaron precipitados y una disminución en la concentración de proteínas, independientemente de la concentración de fosfato de sodio y del pH, solamente la muestra liofilizada mantenida también en estas condiciones, conservó su conformación como lo demuestra la cromatografía de exclusión molecular (Figura 21). Esta muestra además fue positiva en el análisis de actividad biológica realizado mediante citometría de flujo sobre las células LS 174T (resultados no mostrados).

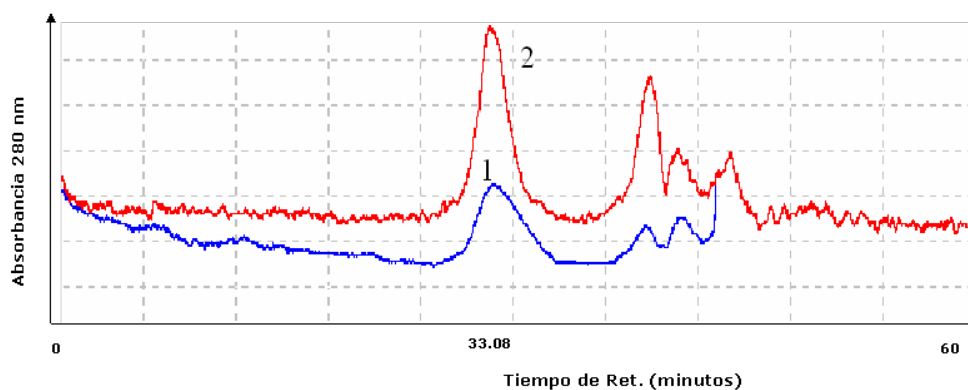


Figura 21: Perfil cromatográfico en Superdex 200 analítica del fragmento anti-CEA M3 liofilizado en tampón fosfato con 2% de sacarosa e incubado durante 5 días a 45°C . (1): Perfil cromatográfico del fragmento a tiempo cero del estudio, (2) Perfil cromatográfico a los 5 días de incubación a 45°C (Se aplicó el doble de proteína).

En el siguiente estudio de formulación, realizado con los dos picos del fragmento anti-CEA y durante el cual se mantuvieron las muestras en el tampón de gel filtración, se analizó el efecto de la variación del pH y de la adición a la formulación de 5 mmol/L de EDTA sobre la estabilidad del fragmento.

En las electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 15% (v/v) realizadas a los 20 días de estudio con las muestras incubadas a 4°C, al comparar con el tiempo inicial del ensayo (Figura 22A), se puede observar la disminución de la talla en las bandas de proteínas que no presentan EDTA, independientemente del pH usado, en algunas muestras se observan bandas de degradación por encima y por debajo de la banda del fragmento (Figura 22B). Como ya se había señalado la talla molecular de ambos picos, en estas condiciones de electroforesis, migran con un peso de 27-30 kDa, levemente por encima de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón cuyas bandas se pueden apreciar tenuemente en la Figura 22A.

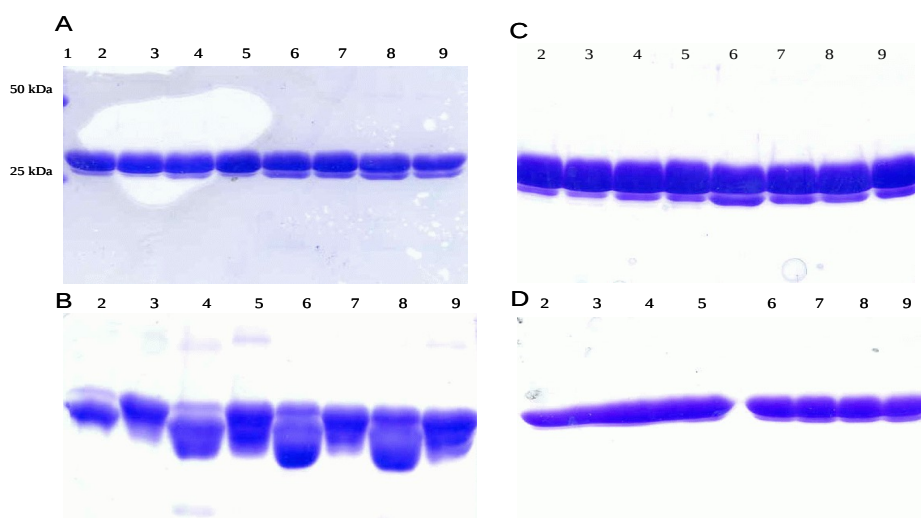


Figura 22: Estudio de pureza en electroforesis de poliacrilamida al 15% teñida con Coomassie blue, de los Picos 1 y 2 del fragmento anti-CEA en presencia de EDTA y varios pH. **A:** Muestras al tiempo 0 del estudio; **B:** Muestras a los 20 días de incubación a 4°C; **C:** Muestras liofilizadas, tiempo 0; **D:** Muestras liofilizadas y mantenidas durante 15 días a 45°C. Línea 1: Patrón de peso molecular (cadena pesada y ligera de Inmunoglobulina de ratón); Línea 2: Pico 2 S/EDTA pH 6.0; Línea 3: Pico 2 C/EDTA pH 6.0; Línea 4: Pico 2 S/EDTA pH 7.8; Línea 5: Pico 2 C/EDTA pH 7.8; Línea 6: Pico 1 S/EDTA pH 6.0; Línea 7: Pico 1 C/EDTA pH 6.0; Línea 8: Pico 1 S/EDTA pH 7.8; Línea 9: Pico 1 C/EDTA pH 7.8.

Las muestras liofilizadas e incubadas a 45°C durante 15 días se mantuvieron estables durante todo el estudio (Figura 22C y D), sin apreciarse alguna influencia del EDTA y del pH de los tampones.

4.10.2 Estudio de Estabilidad del fragmento anti-CEA M3.

Los estudios de estabilidad del fragmento se realizaron para dos lotes del ingrediente farmacéutico activo (IFA), conservados en el tampón para la conservación con una formulación líquida y almacenadas las muestras a -20°C, además se estudiaron dos lotes del producto terminado usando una formulación liofilizada consistente en el tampón para la conservación con la adición de 2% (m/v) de sacarosa y almacenada a 4°C.

Se estudiaron muestras tomadas a cada lote del fragmento al tiempo 0, 1, 2, 3 y 6 meses. Los resultados obtenidos en cada análisis se presentan en la Tabla 7, y demuestran que el fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 mantuvo durante los 6 meses del estudio los parámetros de calidad establecidos previamente. Estos resultados posibilitaron proponer a las autoridades de calidad del CIGB un periodo de 6 meses como el tiempo de estabilidad del fragmento liofilizado y almacenado a 4°C.

Tabla 7: Resultados de los análisis realizados a dos lotes del producto final del fragmento anti-CEA M3. El estudio de estabilidad fue por un período de hasta 6 meses.

Prueba	Meses			
	0	1	3	6
Determinación de Pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	99%	98,3%	99%	99%
Determinación de Pureza por HPLC-Gel Filtración	100%	-	100%	100%
Contaminantes de ADN Hibridación por sonda radioactiva	≤ 100pg de la dosis	≤ 100pg de la dosis	≤ 100pg de la dosis	≤ 100pg de la dosis
Inmuno Identificación por <i>Western Blot</i>	Identificado	Identificado	Identificado	Identificado
Proteínas contaminantes del hospedero	≤ 1,5% de la dosis de 50µg	≤ 1,5% de la dosis de 50µg	≤ 1,5% de la dosis de 50µg	≤ 1,5% de la dosis de 50µg
Actividad Biológica Citometría de Flujo	≥ 50%	≥ 50%	≥ 50%	≥ 50%
Concentración de proteínas totales	1,24 mg/ml	1,020 mg/ml	1,30 mg/ml	1,31 mg/ml

4.11 Secuencia de Aminoácidos por espectrometría de masa del fragmento anti-CEA M3.

La secuencia completa de aminoácidos de la proteína verificada por espectrometría de masas se observa en la Figura 23.

VH----- VH-----VH-----
 EVKLVESGGDLVKPGGSLKFS **CA**ASGPFNRYAMSWVRQTPEKRLEWVAFISSDZIA
 -----VH-----VH-----
 YYADSVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAKYY **CA**RVYYYGSSYFDYWGGQTT
 -----Pépt de unión---VL-----VL-----
 LTVSS **GGGGS**DILMTQSPKFMSTSVGDRVSVT **CA**SQNAAGTNVAWYQQKPGQSPK
 VL-----VL-----
 ALIYSVSSRNSGVPDRITGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYF **CA**QQNSYPLVTFGAGTK

-----VL----c-myc-----HIS

LELKAAAGSE***EQKLISEEDLNSHHHHHH***

Figura 23: Secuencia de aminoácidos obtenida por espectrometría de masa de la fracción monomérica del fragmento anti-CEA M3. En negritas e itálicas las cisteínas que forman los puentes disulfuro, el péptido de unión, el péptido etiqueta c-myc y la cola de histidinas.

El resumen de los péptidos secuenciados y los espectros ESI MS/MS se muestran en el (Anexo 3). El tipo y la posición de cada aminoácido que compone la molécula monomérica del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 se confirmaron y coincidieron con las secuencias teóricas. Se confirmó además, la existencia de los puentes disulfuro, dos en la región variable de la cadena pesada (cisteínas 22-95) y dos en la región variable de la cadena ligera (cisteínas 147-212), la existencia del péptido de unión de 5 aminoácidos, el péptido etiqueta y la cola de histidinas situados en el extremo carboxilterminal. La masa molecular experimental para la fracción monomérica del fragmento de 27971.21 Da se diferenció en sólo 0.12 Da de la masa molecular esperada (27971.09 Da). En total la secuencia aminoacídica de la proteína se verificó hasta un 94% y quedaron secuenciados los extremos amino y carboxilo terminales.

4.12 Radiomarcaje del fragmento anti-CEA M3 con ^{125}I y ^{131}I . Estabilidad del radiomarcaje *in vitro*.

El fragmento anti-CEA M3 se marcó con los isótopos radiactivos ^{125}I y ^{131}I por el método de la cloramina T. En los experimentos realizados los mejores resultados se obtuvieron a pH 7.0 con una relación molar de cloramina T:Proteína de 50:1. El promedio de marcaje para ambos isótopos, estimado en cromatografía de capa fina, se mantuvo sobre el $92,5 \pm 4,3\%$.

La integridad de la molécula después de marcada se comprobó mediante cromatografía en FPLC. La Figura 24 muestra la pureza del fragmento anti-CEA M3 (Pico 1), después de marcado con el radioisótopo ^{131}I a una baja actividad específica y comparado con el fragmento sin marcar. Resultados similares se obtuvieron con la misma molécula marcada con ^{125}I . Como se puede observar el fragmento radiomarcado mantiene su talla molecular aparente en gel filtración, no observándose por este método agregación ni degradación de la proteína.

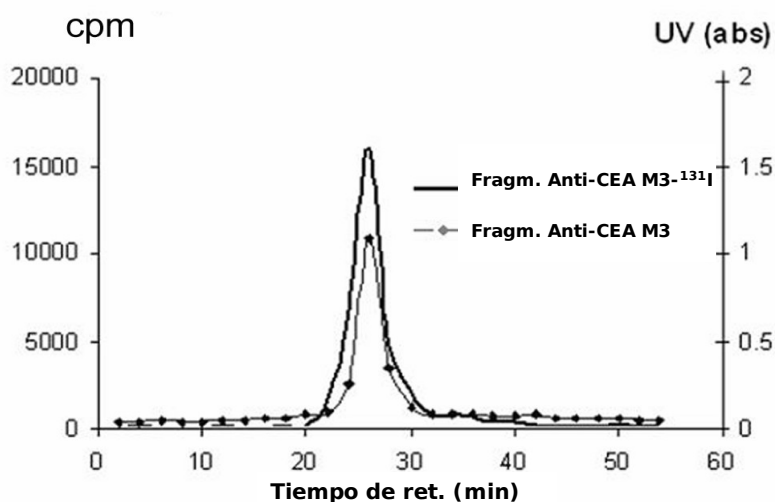


Figura 24: Análisis de la estabilidad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I mediante FPLC.

Cromatogramas de los análisis del fragmento anti-CEA M3 realizados en FPLC antes y después de marcado con ^{131}I , 100 μg del fragmento no marcado se aplicaron a la columna HR 10/30 de Superosa 12, con un flujo de corrida de 1 mL/minuto, la elución se monitoreó mediante absorbancia a 280 nm. En el caso del fragmento marcado con ^{131}I , se aplicaron a la columna 50 μg del fragmento, el flujo de corrida se mantuvo a 1 mL/minuto y fracciones correspondientes al volumen eluido en 1 minuto se recogieron y midieron en el contador gamma, los valores en cpm de cada fracción se graficaron y la curva obtenida superpuesta al cromatograma del fragmento sin marcar con el fin de estimar el tiempo de retención en ambos casos.

Después de realizar el marcaje del fragmento anti-CEA M3 con mayor actividad específica de ^{131}I y de analizar la integridad de la molécula en FPLC, se demostró en el perfil radiocromatográfico obtenido que aún con estas condiciones el fragmento no pierde su conformación original (resultados no mostrados).

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de la conjugación del fragmento con el yodo radioactivo, se incubó el fragmento radiomarcado con ^{131}I a baja y alta actividad específica en PBS y suero humano. Durante este estudio se estimó por cromatografía en capa fina la cantidad de ^{131}I que se desprende del fragmento y que es detectada como yodo libre. Se demostró que el fragmento mantiene una estabilidad en el marcaje con el isótopo de un 100% hasta las 24 horas de incubación en ambos medios. Después de las 48 y hasta las 72 horas de incubación a 37°C en presencia de PBS o de suero humano respectivamente se determinó desde un 20% hasta un 30% de ^{131}I libre.

4.13. Inmunorreactividad del Fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con yodo.

La inmunorreactividad del fragmento anti-CEA M3 después de marcado con los isótopos ^{125}I y ^{131}I se analizó al incubar el radioconjugado con el CEA humano purificado o expresado en la membrana de las células LS 174T. En el caso del fragmento radiomarcado con ^{125}I , el análisis se efectuó sobre las células, los resultados obtenidos se interpretan mediante la comparación entre el fragmento y el anticuerpo completo que también se radiomarcó con ^{125}I y se empleó en el mismo experimento. Para el caso específico del fragmento marcado con ^{131}I la inmunorreactividad se analizó directamente sobre el antígeno CEA humano y no se utilizó el anticuerpo completo como control.

Los resultados del experimento de inmunorreactividad realizado con el fragmento anti-CEA M3- ^{125}I y el AcM CB/iorCEA1- ^{125}I sobre células LS 174T que expresan el antígeno en membrana se presenta en la Figura 25.

Los gráficos muestran la recta obtenida al plotear los valores inversos donde se aprecia el intercepto en Y que corresponde a una concentración infinita de antígeno, al dividir 1 entre el intercepto, se obtuvieron valores de inmunorreactividad de 25,7% para el fragmento (Figura 25A) y de 34,2% para el anticuerpo monoclonal (Figura 25B).

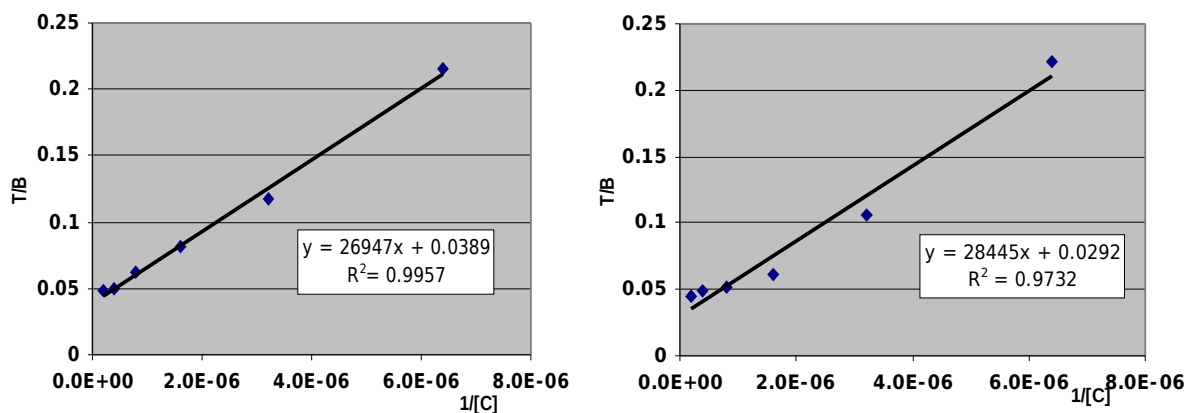


Figura 25: Análisis de la inmunorreactividad del fragmento anti-CEA M3 y del anticuerpo monoclonal murino CB/iorCEA. 1, ambos radiomarcados con ^{125}I , sobre las células LS 174T fijadas en placas de 24 pozos. Experimento realizado sobre células LS 174T fijadas sobre una placa de 24 pozos a concentraciones desde 150 000 hasta 5 000 000 células por pozo. Se emplearon 26 y 76,9 ng/pozo del fragmento y el anticuerpo marcados respectivamente, que se incubaron con las células. Las cantidades de fragmento (Figura 25A) o anticuerpo radioactivo (Figura 25B) que quedaron unidos en cada concentración celular se colectaron y se midieron en el contador gamma. Las rectas se obtuvieron al graficar el inverso de los porcentajes del total de fragmento y/o AcM empleados entre los fragmentos y/o AcM que quedaron unidos a las células (T/B) para cada concentración celular.

La inmunorreactividad del fragmento radiomarcado con ^{131}I se estimó incubando con el antígeno en solución. Los radiocromatogramas de las corridas realizadas en FPLC después de incubar el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I a baja y elevada actividad específica con el antígeno CEA se presentan en la Figura 26.

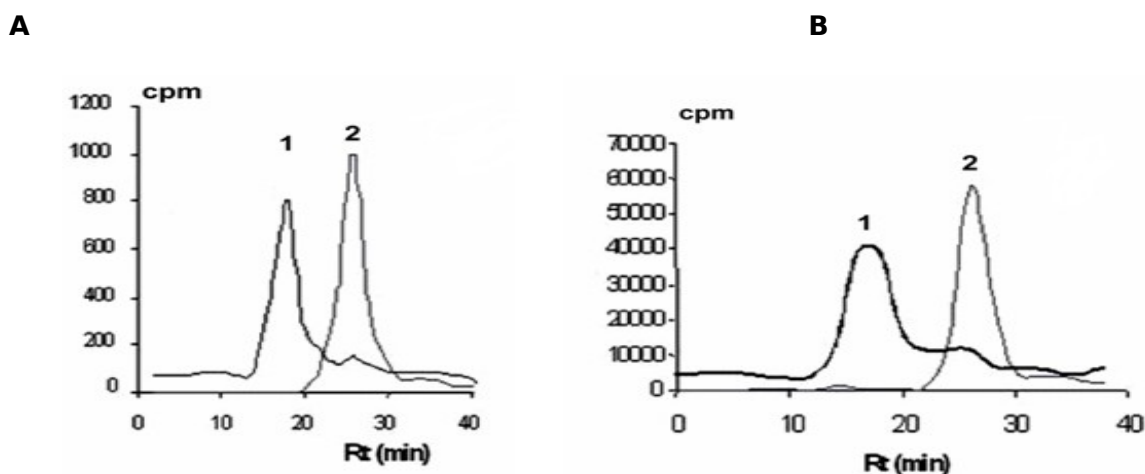


Figura 26: Inmunorreactividad del fragmento anti-CEA M3- ^{131}I . A y B: Radiocromatograma de las purificaciones en FPLC del fragmento marcado con ^{131}I a baja (A) y alta (B) actividad específica antes y después de incubar con el antígeno CEA en solución. Pico 1: Inmunocomplejo antígeno-fragmento; Pico 2: Fragmento radiomarcado. La inmunorreactividad se estimó calculando el área bajo la curva del inmunocomplejo (Wu y col. 1999).

Como se observa existe una fracción de proteína que eluye con un tiempo de retención aproximado de 19 minutos correspondiente al inmunocomplejo proteína-fragmento de

anticuerpo (Pico 1, Figura 26A y B). En ambos cromatogramas hay presente un segundo pico que corresponde a fragmentos que no han reaccionado con el antígeno, el cual coincide con el pico 2 procedente de la elución del fragmento radiomarcado sin incubar con el CEA, estos picos presentan un tiempo de retención cercano a los 27 minutos de corrida.

En el radiocromatograma del fragmento radiomarcado con alta actividad específica se aprecia que el incremento de la radioactividad en la molécula no alteró la estructura dimérica de la misma (Figura 26B, pico 2).

La inmunorreactividad del fragmento anti-CEA M3-¹³¹I estimada mediante el cálculo del área bajo la curva de los dos picos presentes en la cromatografía del inmunocomplejo es de aproximadamente el 85% tanto con baja como con alta actividad específica del isótopo.

4.14 Efecto del radiomarcaje con ¹²⁵I sobre la Afinidad del fragmento anti-CEA M3.

La constante de afinidad del fragmento anti-CEA M3 después de radiomarcado con ¹²⁵I se calculó sobre las células LS 174T fijadas en placas de 24 pozos. En la Figura 27 se presentan las rectas obtenidas al graficar los valores de la relación entre los anticuerpos unidos al antígeno y los anticuerpos libres (B/F) contra la concentración molar utilizada de los anticuerpos, las pendientes de estas rectas presentaron valores de 1×10^7 (mol/L)⁻¹ para el fragmento anti-CEA M3 (Figura 27B), mientras que el valor para el anticuerpo CB/iorCEA1 fue de 2×10^7 (mol/L)⁻¹ (Figura 27A).

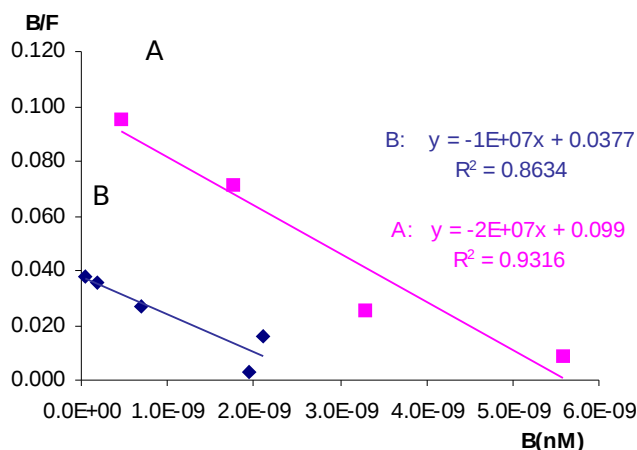


Figura 27: Afinidad del fragmento anti-CEA M3-I¹²⁵ (B) y del anticuerpo monoclonal CB/iorCEA1-¹²⁵I (A) sobre células LS 174T fijadas en placas de 24 pozos.

Diluciones desde 0,06 hasta 200 µg/mL del fragmento anti-CEA y del anticuerpo CB/iorCEA.1 no marcados se incubaron con células LS 174T fijadas a una placa de 24 pozos a una concentración fija de 500 000 células/pozo. Después de lavar la placa, los fragmentos y el anticuerpo unidos a las células se analizaron en el contador gamma, determinándose la cantidad de anticuerpo que quedó unido a las células del total de anticuerpos incubados. La pendiente de la curva corresponde con la constante de afinidad de las moléculas.

Para el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I no se ha realizado el cálculo de la afinidad.

4.15 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado en modelos animales.

Con el objetivo de demostrar la biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado, se emplearon ratones como modelo animal. Comenzamos los experimentos con ratones sanos de la cepa NMRI y marcando la molécula con el isótopo ^{125}I . A los ratones se les administró por vía intravenosa el fragmento anti-CEA M3- ^{125}I . Después de las 24 horas de la inyección quedó demostrado que este producto no se acumulaba en ninguno de los órganos críticos analizados. Los valores del %ID/g eran menores de 0.25 en todos los casos (resultado no mostrado). Estos resultados permitieron continuar los estudios del fragmento en ratones con tumores.

4.15.1 Biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{125}I en ratones atómicos.

La biodistribución del fragmento anti-CEA M3 marcado con ^{125}I se estudió en ratones xenotrasplantados con células tumorales humanas LS 174T (imagen del ratón con el tumor en el Anexo 4).

Los porcentos de dosis inyectada por gramos de tejido (%ID/g) en los tres períodos analizados (24, 48 y 72 horas) se muestran en la Figura 28.

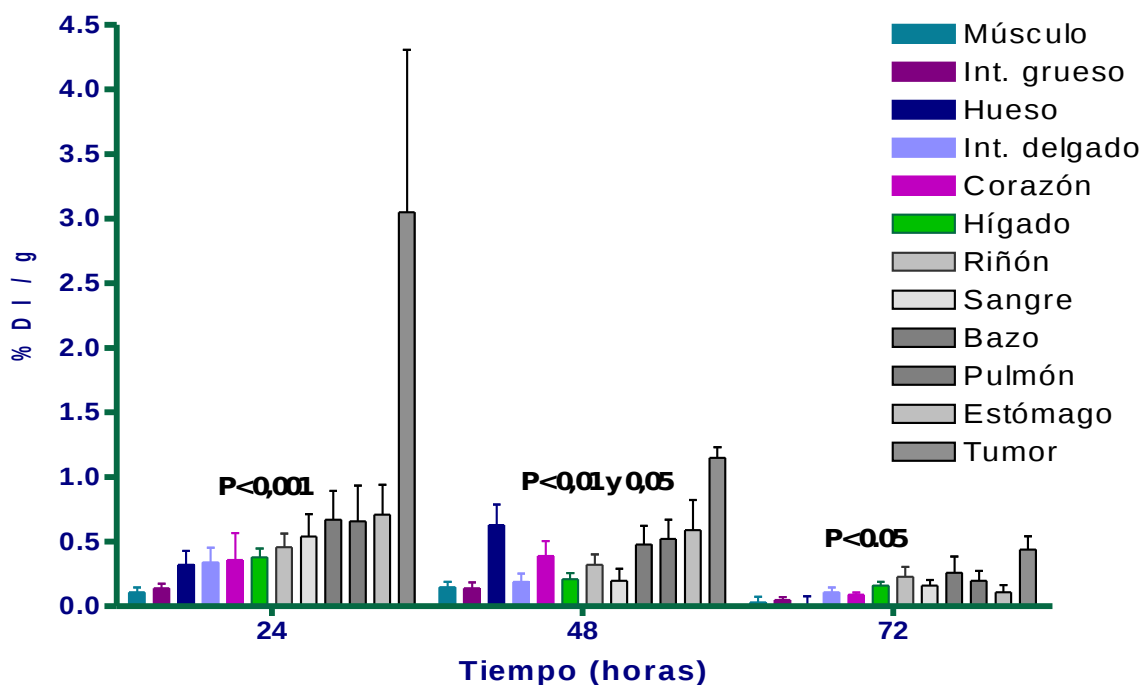


Figura 28: Biodistribución del fragmento anti-CEA- ^{131}I en ratones atómicos xenotrasplantados con células humanas LS 174T. %ID/g del fragmento anti-CEA M3- ^{125}I para los principales órganos a las 24, 48 y 72 horas post-administración. Una dosis total de $5\ \mu\text{g}$ de fragmento marcado con ^{125}I se inyectó por vía intravenosa en 15 ratones atómicos xenotrasplantados con $4\text{-}5 \times 10^6$ células tumorales humanas LS174T. Cinco ratones se sacrificaron a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección y una muestra de sus principales tejidos se examinó. La radioactividad presente en ellos se midió en el contador gamma y el porcentaje de la dosis inyectada para cada tejido se calculó dividiendo este valor entre el total administrado, restando el decaimiento del isótopo en una muestra patrón en cada tiempo.

Todos los valores están referidos a la media \pm la desviación estándar. La mayor acumulación del fragmento en tumor se alcanzó a las 24 horas de la inyección con 3,05 %ID/g,

para este tiempo también se alcanzaron los mayores valores de %ID/g en el resto de los órganos, excepto en hueso donde a las 48 horas de la inyección se observó un pico de actividad radioactiva. Transcurridas las 72 horas de la inyección el %ID/g en todos los órganos se encontraba por debajo de 0.5% mientras que en el tumor se observaron acumulados cercanos a este valor. Durante todo el estudio los menores acumulados de %ID/g se encontraron en el intestino grueso y el músculo, además se observó que la acumulación en los riñones siempre fue superior al hígado.

Los resultados de %ID/g en cada órgano se compararon con los valores del tumor mediante una prueba ANOVA, seguida de una prueba tipo Dunnet. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante todo el período de estudio, entre el tumor y cada uno de los tejidos analizados, con una P menor a 0,001 durante las primeras 24 horas y menor a 0,05 transcurridas las 72 horas de la administración. Se observó una cinética de disminución en el tiempo, de la acumulación del fragmento radioactivo en casi todos los órganos, con excepción del hueso, donde los mayores valores se alcanzaron a las 48 horas de la administración del producto, aunque este valor es prácticamente cero a las 72 horas, no obstante las diferencia en el %ID/g entre este tejido y el tumor continuaron siendo significativas a las 48 horas.

En la Tabla 8 se muestran los resultados del análisis entre el %ID/g en el tumor con relación a varios tejidos. Como se puede apreciar a las 48 horas de la inyección se produce la máxima relación entre el %ID/g en el tumor con respecto al %ID/g en sangre, con un valor de 8,05. A las 72 horas la relación %ID/g del tumor con relación a la sangre era de 2,98 veces favorable al tumor. Al analizar las relaciones entre los valores de %ID/g en el tumor con el hígado, los pulmones, el bazo y los riñones se observa que durante todo el estudio las mismas son favorables al tumor, durante las primeras 24 horas de la inyección se obtienen valores de 8,03 y 6,63 para el hígado y los riñones, las relaciones del tumor con estos tejidos a las 72 horas eran de 2,75 y 1,91 respectivamente. Cuando comparamos los %ID/g entre el tumor y los pulmones y el bazo se observan valores desde 4,62 y 4,55 a las 24 horas hasta 2,20 y 1,69 a las 72 horas respectivamente.

Las relaciones entre los %ID/g del hígado y los riñones comparados con la sangre durante todo el análisis muestra valores mayores con los riñones que con el hígado, siendo esta la principal vía de excreción. A las 72 horas de la administración del fragmento radiomarcado se calculó 1,43 veces más radioactividad en los riñones que en la sangre, mientras que en el hígado existía la misma radioactividad.

Tabla 8: Relación entre los valores de %ID/g del fragmento marcado con ^{125}I en el tumor y los valores de %ID/g en los tejidos (órganos) más vascularizados o de excreción, durante los diferentes tiempos después de la administración del producto.

Relación %ID/g del tumor :%ID/g tejidos	24 horas	48 horas	72 horas
Tumor:Sangre	5,69	8,05	2,98
Tumor:Hígado	8,03	5,48	2,75
Tumor:Pulmón	4,62	2,21	2,20
Tumor:Bazo	4,55	2,40	1,69
Tumor:Riñones	6,63	3,59	1,91
Hígado:Sangre	0,7	1,05	1,0
Riñones:Sangre	0,85	1,60	1,43

4.15.2 Biodistribución del fragmento radiomarcado con ^{131}I en ratones atómicos.

La biodistribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con baja actividad específica de ^{131}I e inyectado en ratones atómicos xenotrasplantados con células tumorales humanas LS 174T se presenta en la Figura 29.

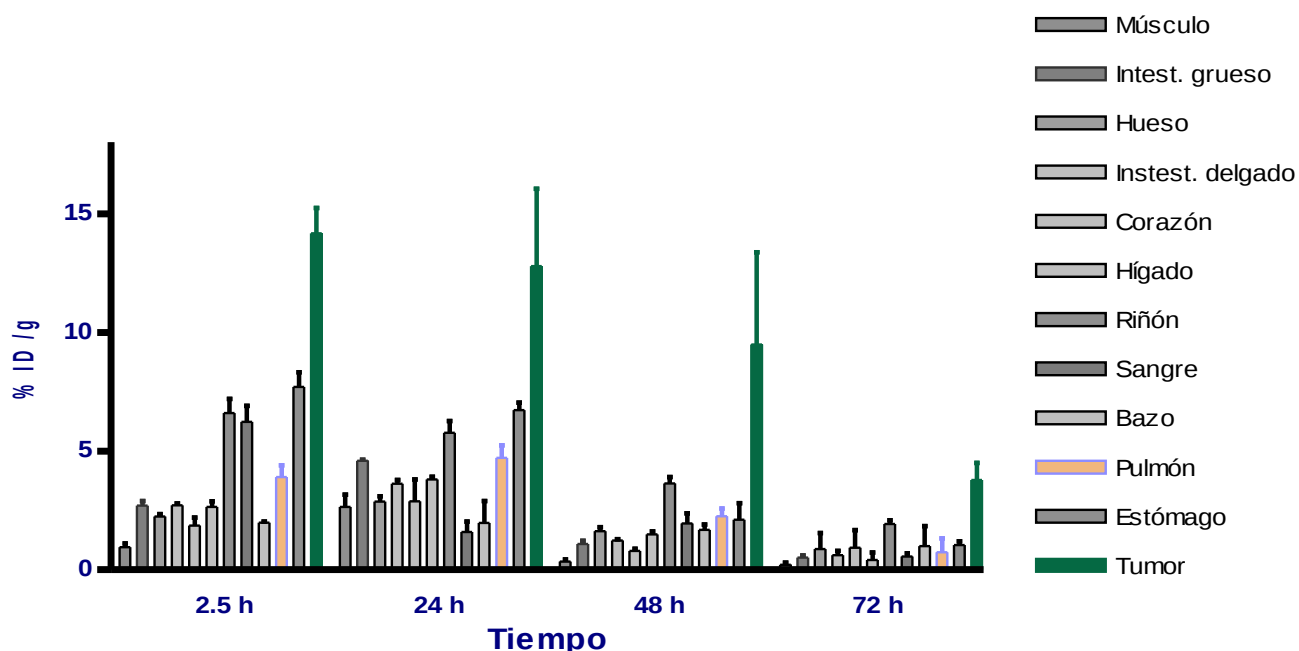


Figura 29: Biodistribución del fragmento anti-CEA M3- ^{131}I en ratones atómicos xenotrasplantados con células LS 174T. %ID/g del fragmento anti-CEA M3- ^{131}I para los principales órganos a las 2,5; 24; 48 y 72 horas post-administración. Una dosis total de 12 μCi de fragmentos marcado con ^{131}I se inyectó por vía intravenosa en ratones atómicos xenotrasplantados con $4-5 \times 10^6$ células tumorales humanas LS174T. 3 ratones se sacrificaron a las 2,5; 24; 48 y 72 horas después de la inyección. Una muestra de los principales tejidos se aisló y se pesó. La radioactividad presente en ellos se midió en el contador gamma. El porcentaje de la dosis inyectada presente en cada tejido se calculó teniendo en cuenta el decaimiento del isótopo con el tiempo.

Los resultados demuestran una rápida acumulación en el tumor con un valor máximo de 14,16 %ID/g a las 2,5 horas de la administración. Como se puede observar en la gráfica los valores máximos de marcajes se obtuvieron en el tumor durante todo el estudio (%ID/g en tumor de 12,78; 9,48 y 3,79 para 24, 48 y 72 horas). A las 2,5 horas de la administración la media de

los valores de %ID/g en sangre, hígado, pulmón, bazo y riñones eran de 6,23; 2,64; 3,91; 1,99 y 6,60 respectivamente. Estos valores disminuyeron con el tiempo y a las 72 horas de la administración eran de 0,55; 0,41; 0,74; 0,99; 1,92 %ID/g para cada uno de ellos. Las mayores diferencias entre los %ID/g en el tumor con relación al resto de los tejidos se observaron a las 48 horas de la administración. A las 72 horas los valores de %ID/g en prácticamente todos los tejidos, excepto riñones, se redujeron drásticamente manteniéndose el marcaje elevado en el tumor.

En la Tabla 9 se presentan los resultados obtenidos al analizar la relación de de %ID/g entre el tumor y diversos tejidos durante el tiempo de muestreo. La relación entre el %ID/g del tumor y el %ID/g para la sangre alcanzó un máximo de 7,98 a las 24 horas de la administración. Las mayores diferencias entre el %ID/g del tumor y el % ID/g en el hígado, los pulmones y los riñones se registraron a las 48 horas con valores de 6,36; 4,20; 2,61 respectivamente, mientras que la mayor diferencia con el bazo ocurrió en las primeras horas de la administración con 7,11 veces mas en tumor. Demostrandose la acumulación preferencial del fragmento radiomarcado en el tumor.

Tabla 9: Relación entre los valores de %ID/g del fragmento marcado con ¹³¹I en el tumor y los tejidos (órganos) más vascularizados o de excreción, a los diferentes tiempos después de la administración del producto.

Relación %ID/g del tumor : %ID/g tejidos	2,5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tumor:Sangre	2,41	7.98	4,86	4,42
Tumor:Hígado	5,37	3,37	6,36	4,25
Tumor:Pulmón	3,62	2,71	4,20	2,77
Tumor:Bazo	7,11	6,48	5,61	2,26
Tumor:Riñones	2,14	2,22	2,61	1,64
Hígado:Sangre	0,47	2,37	0,76	0,74
Riñones:Sangre	1,12	3,6	1,86	2,69

Analizando las diferencias entre el %ID/g en el hígado y los riñones con relación a los valores de %ID/g de la sangre se observa que a las 24 horas de la administración del producto los valores de estos son de 2,37 y 3,6, lo cual demuestra que los riñones son la vía principal de excreción del fragmento. A las 72 horas de la administración del producto existía 2,69 veces más %ID/g en el los riñones que en la sangre.

4.15.3 Gammagrafía en ratones atómicos con el fragmento anti-CEA-¹³¹I.

Con el proposito de explorar la utilidad de fragmento anti-CEA M3 en la captación de imágenes gammagráficas, el fragmento radiomarcado con ¹³¹I a una alta actividad específica se

administró a ratones atímicos xenotrasplantados con células LS 174T. La Figura 30 muestra las imágenes gammagráficas tomadas a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección.

Se puede observar en las imágenes tomadas a las 24 horas la radiolocalización del tumor por el fragmento de anticuerpo anti-CEA M3- ^{131}I . Las gammagrafías también muestran la acumulación del fragmento en la tiroides (glándula que no se bloqueó previamente y que tiene afinidad por el yodo) y el patrón de orientación colocado a la derecha del animal. Durante las 48 y 72 horas no se observó marcaje al parecer debido a un rápido aclaramiento de la molécula. La gran acumulación observada en la tiroides demuestra la presencia de isótopos libres y puede haber contribuido a la disminución de la señal en el tumor.

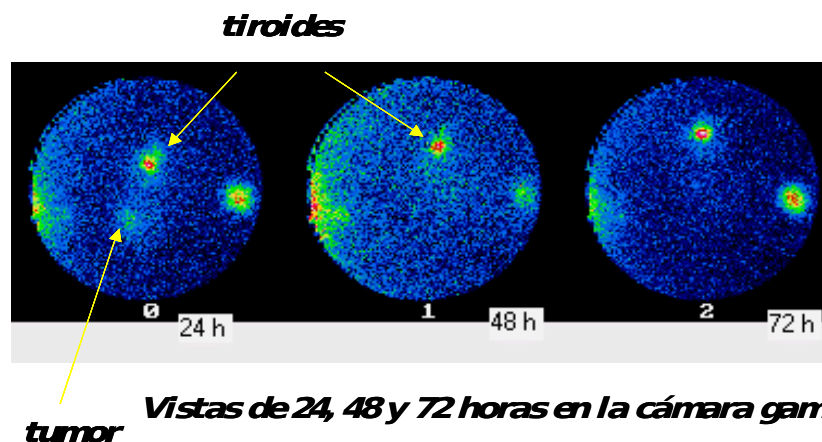


Figura 30: Gammagrafías realizada en ratones atímicos xenotrasplantados con células tumorales humanas LS 174T.

Para la gammagrafía se emplearon 2 ratones atímicos, que se inyectaron con 5 μg de fragmento anti-CEA marcados con 150 μCi de ^{131}I , las imágenes se tomaron a las 24; 48 y 72 horas posteriores a la inyección, después de anestesiarse al ratón. En la imagen tomada a las 24 horas se observa la captación tumoral. En el resto de las imágenes esta señal fue muy tenue y no se observa, se obtuvo además acumulación del isótopo en la tiroides. El punto observado a la derecha de la imagen corresponde a un patrón usado para definir la orientación del animal.

4.16 Estudio del fragmento anti-CEA radiomarcado con ^{131}I en pacientes con cáncer colorectal.

En el marco de un ensayo clínico en pacientes con cáncer colorectal, el fragmento anti-CEA radiomarcado con ^{131}I se administró en una única dosis de 0,3 mg. Esta dosis no provocó eventos adversos en ninguno de los pacientes tratados. Los valores de anticuerpos anti fragmentos anti-CEA M3 presentes en el suero de los pacientes después de 1 mes de la inyección estuvieron en todos los casos por debajo de 1 ng/mL.

Al comenzar el ensayo los niveles séricos de CEA en los pacientes oscilaron entre los 2,18 y 11,21 ng/mL (los parámetros establecidos por el laboratorio clínico como niveles normales del CEA en suero se encuentran entre 0 y 4,60 ng/mL), por lo que algunos de ellos tenían alterados este indicador.

4.16.1 Estudio de la estabilidad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I en el suero de los pacientes.

En la Figura 31 se muestra con un ejemplo la estabilidad del fragmento radiomarcado con ^{131}I en el suero de los pacientes. El radiocromatograma obtenido en el estudio por FPLC de las muestras de suero tomadas a los pacientes en diferentes tiempos después de la administración del fragmento, reflejó que desde los primeros 30 minutos de la administración eluye una fracción que tiene un tiempo de retención aparente de 18 minutos y que corresponde con el inmunocomplejo formado entre el fragmento y el CEA circulante. Este resultado se demostró con el análisis de la inmureactividad realizado en paralelo. Posteriormente eluyó un segundo pico a un tiempo de retención de 23 minutos que se corresponde con el tiempo de retención del patrón (fragmento anti-CEA M3- ^{131}I).

En la figura 31 se puede apreciar además que a las 2 y 24 horas estas fracciones están presentes aunque a concentraciones menores. Los picos observados al final de las corridas (61 minutos) corresponden al yodo libre desprendido de la proteína y que se incrementa después de las 24 horas.

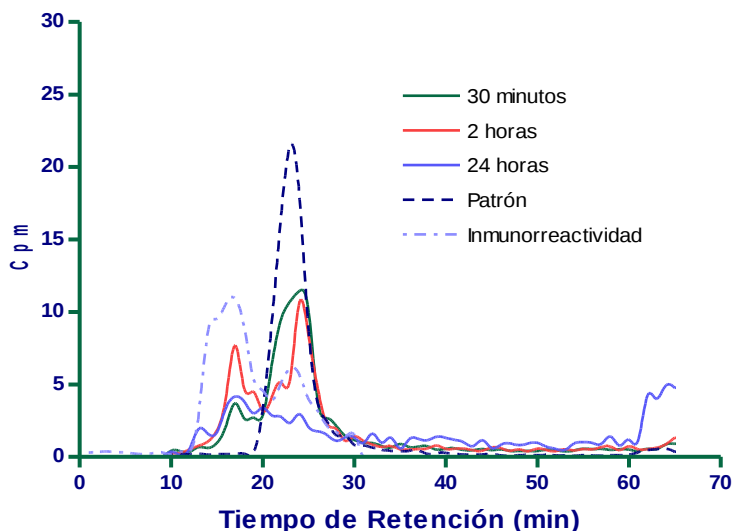
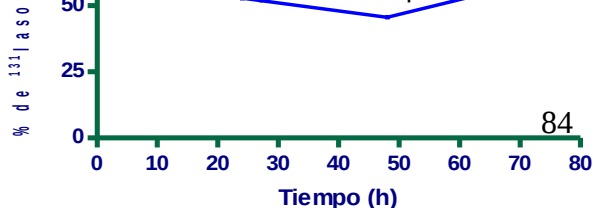


Figura 31: Radioinmuncromatograma del fragmento anti-CEA M3 marcado con ^{131}I en el suero de uno de los pacientes.

Para el FPLC se aplicaron a la columna 10/60 de Superosa 12 un volumen de 100 μL de suero de los pacientes obtenidos a los 30 minutos, 2 y 24 horas después de la inyección. El flujo de trabajo se mantuvo a 0,5 mL/minuto colectándose fracciones de 0,5 mL que se midieron en el contador gamma. El radiocromatograma se obtuvo al graficar los cpm de cada fracción por el tiempo de corrida.

Como experimento adicional, se tomó 1 mL del suero y se precipitaron las proteínas presentes, con el objetivo de conocer exactamente las cantidades de ^{131}I que se mantienen unidas al fragmento anti-CEA M3. En la Figura 32 se aprecia el promedio de estos análisis en los cinco pacientes, y se demuestra que cerca del 50% del ^{131}I presente en la circulación sanguínea 48 horas después de la inyección al paciente estaba aún asociado a la proteína. El incremento



que se observa posterior a esta hora puede ser debido a la disociación de parte de los fragmentos radiomarcado que aún permanecen en el tumor.

Figura 32: Promedio del porcentaje de ^{131}I asociado a proteína precipitadas del suero de los pacientes incluidos en el estudio. 1 mL de suero se precipitó con 10% de TCA, después de centrifugar, se lavó el precipitado en dos ocasiones con PBS. La radioactividad presente tanto en el precipitado como en el sobrenadante se midió en el contador de centelleo.

4.16.2 Excreción en la orina de la actividad inyectada a los pacientes.

En la Figura 33 se puede apreciar el promedio del porcentaje de excreción en la orina de la actividad inyectada en los cinco pacientes. Como se observa la excreción de la actividad radioactiva en la orina se incrementa con el tiempo durante las primeras 24 horas de la administración, produciéndose un pico máximo en el intervalo de tiempo entre las 8 y 24 horas. Se calcula que durante este intervalo ocurre cerca de un 40% de excreción de la actividad inyectada, estimándose que el 2% de está se encuentra aún asociada al fragmento de anticuerpo. A las 72 horas de administrado el fragmento radiomarcado se calculó que el $85,47 \pm 11,72\%$ de la radioactividad había sido excretada en la orina. El porcentaje de esta radioactividad que se encuentra asociada al fragmento anti-CEA M3 a las 72 horas se calculó en un 2,2%.

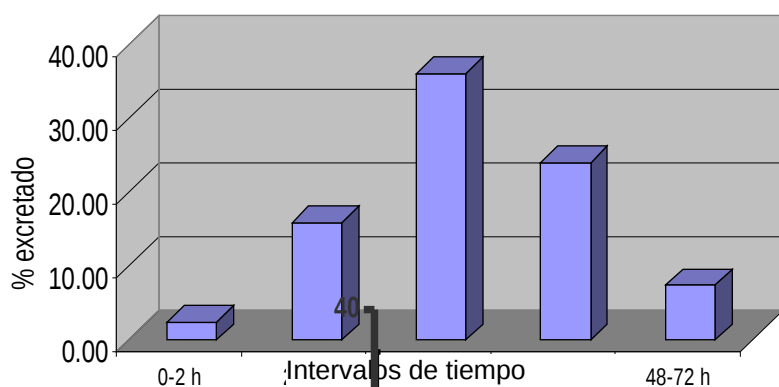
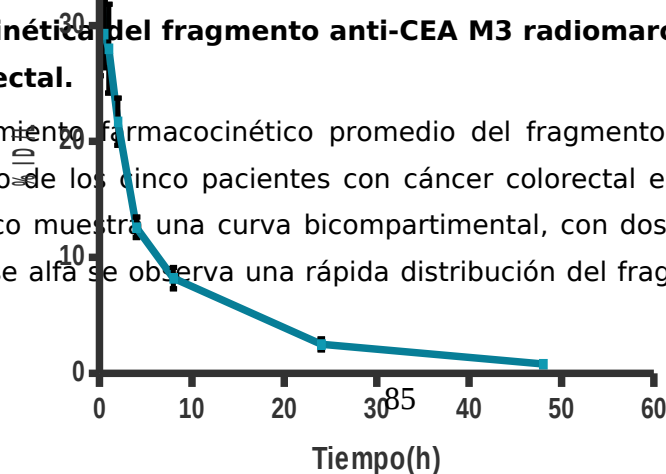


Figura 33: Porcentaje de excreción en la orina de la actividad inyectada (promedio de 5 pacientes).

Un volumen de 1 mL se colectó después de medir la cantidad total de orina excretada para cada intervalo de tiempo. La radioactividad se estimó en el contador gamma y se calculó el porcentaje que representaba ese valor del total inyectado restandole el valor de decaimiento del isótopo en cada hora.

4.16.3 Farmacocinética del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I en Pacientes con cáncer colorectal.

El comportamiento farmacocinético promedio del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I en el suero de los cinco pacientes con cáncer colorectal estudiados se presenta en la Figura 34. El gráfico muestra una curva bicompartimental, con dos fases alfa y beta muy bien definidas. En la fase alfa se observa una rápida distribución del fragmento durante las primeras



4 horas de la administración, mientras que en la fase beta se observa una lenta eliminación. El porcentaje de la dosis inyectada por Litro de suero era muy bajo a las 50 horas de la inyección.

Figura 34: Curva promedio de la Farmacocinética del fragmento anti-CEA M3 marcado con ¹³¹I e inyectado por vía intravenosa en pacientes con cáncer colorectal.

Muestras de suero se tomaron a los 5; 15; 30; 60; 120 minutos y a las 4; 8; 24; 48 y 72 horas después de la inyección, 1 mL de cada muestra se midió en el contador gamma y se estimó el porcentaje correspondiente de la dosis inyectada entre el volumen sanguíneo de distribución. Los valores de la farmacocinética se obtuvieron en el programa WinNonlin.

En la tabla 10 se pueden observar algunos parámetros obtenidos con el Winnolin, donde se refleja que el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I tarda un tiempo de 3,2 horas en completar la primera fase alfa de la distribución, mientras que la fase beta se produce en 20,01 horas, debido a la eliminación lenta de la circulación. El análisis de los parámetros farmacocinéticos promedios de los 5 pacientes muestra un tiempo medio de residencia (MRT) del fragmento radiomarcado de 20,18 horas, con un tiempo medio de eliminación (K10-HL) de 6,96 horas. La concentración máxima alcanzada (Cmax), en %ID/L, es de 24,4% y el aclaramiento (CI) es de 0,41 %ID L/horas.

Tabla 10: Valores promedio en los parámetros de la farmacocinética del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I en el suero de cinco pacientes con cáncer colorectal.

Parámetros	Valores Estimados	Error estándar	C.V.%
Alpha-HL	3,20	0,40	12,52
Beta-HL	20,01	6,90	34,52
K10-HL	6,96	0,64	9,2
Cmax	24,44	0,24	1,02
Cl	0,41	0,037	9,07
MRT	20,18	5,59	27,73

Alpha-HL: Tiempo medio de la primera fase (h)

Beta-HL: Tiempo medio de la segunda fase (h)

K10-HL: Tiempo medio de eliminación (h)

Cmax: Concentración máxima (%ID/L)

Cl: Aclaramiento (%ID L/h)

MRT: Tiempo medio de residencia (h)

4.16.4 Evidencias Gammagráficas de la captación tumoral del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I .

La Figura 35 muestra un ejemplo de la gammagrafía realizada a cada uno de los pacientes en los diferentes tiempos después de la administración del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I .

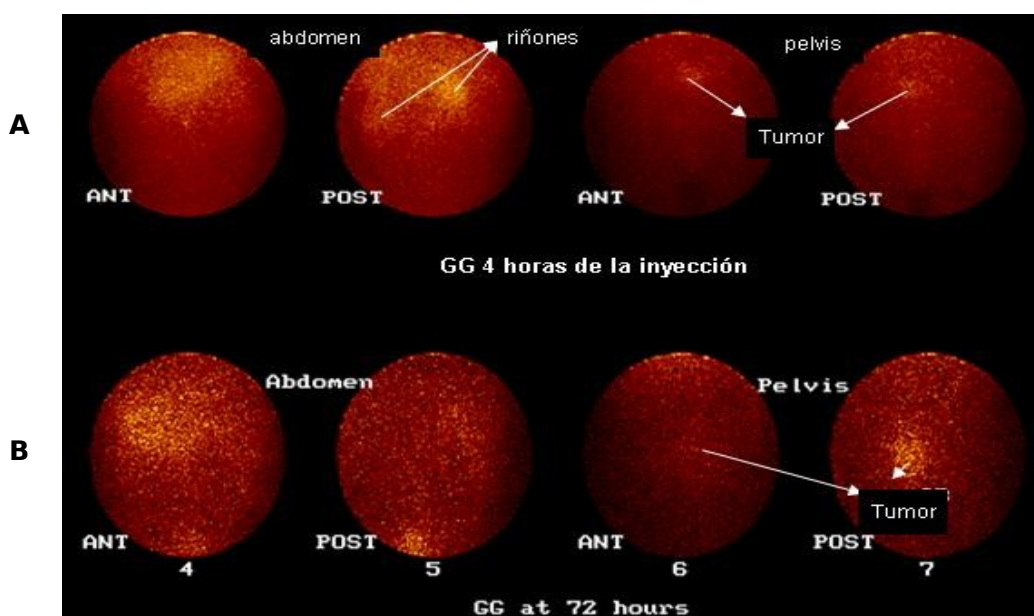


Figura 35: imágenes Gammagráficas de un paciente inyectado con 0,5 mg del fragmento anti-CEA M3- ^{131}I . Las imágenes se tomaron en una cámara gamma GE 400, con un índice de contraste de 0,2, se presentan imágenes anterior y posterior del abdomen y la pelvis tomadas a las, **A:** 4 horas de la inyección y **B:** 72 horas del estudio.

En la gammagrafía realizada sobre la zona del abdomen y la pelvis durante las primeras horas de la admistración del producto (Figura 35A), no se observaron acumulaciones inespecíficas del fragmento en órganos críticos ni tampoco en medula ósea. Las señales más

intensas se observaron en los riñones y la vejiga. En la imagen posterior de la pelvis se puede observar la captación del fragmento unido al tumor.

En las imágenes tomadas a las 72 horas (Figura 35B), la captación del fragmento anti-CEA M3 en el tumor se hizo más evidente en la toma posterior de la pelvis, cuando gran parte del fragmento circulante ya ha sido eliminado de la circulación sanguínea. Comparando las imágenes gammagráficas tomadas de la pelvis anterior y posterior se logró descartar el fondo que pudo estar creando la acumulación de la actividad en la vejiga, teniendo en cuenta que en este caso el tumor estaba situado en la región del sigmoide que se encuentra ubicado detrás de la vejiga.

5. Discusión

5.1 Expresión y Purificación del fragmento anti-CEA M3.

El desarrollo y el éxito alcanzado por la ingeniería genética y la biotecnología han sido posibles, entre otros factores, debido al empleo de un amplio número de vectores y células que conforman los sistemas para la expresión y producción de las proteínas de interés. Dentro de estos, la utilización de los modelos bacterianos para la expresión de proteínas recombinantes presenta múltiples ventajas que incluyen la capacidad de producir grandes cantidades de proteínas, la accesibilidad para introducir modificaciones genéticas, el requerimiento de medios de cultivo baratos y los vastos conocimientos adquiridos acerca de la genética y la fisiología bacteriana (Plückthun, 1991; Joosten y col., 2003).

Sin embargo, dentro de los problemas a los cuales nos enfrentamos cuando se decide utilizar los sistemas de expresión en procariontes se encuentran las diferencias que existen entre los procesos post-traduccionales de estas células y los de las células eucariota, tales como: la glicosilación, la fosforilación, la acetilación, etc (Hanes y col., 1999). No obstante, son numerosos los ejemplos de proteínas producidas en sistemas procariontes que demuestran la conveniencia y factibilidad del uso de estos organismos (Soares y col., 2003).

Para el caso específico del empleo de un modelo de expresión bacteriano en la obtención y producción de los fragmentos de anticuerpos los mayores inconvenientes serían con la ausencia de glicosilación característica de estos modelos, sin embargo, es reconocido que los fragmentos de anticuerpos conformados por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, por lo general carecen de sitios de glicosilación (Plückthun y col., 1996).

Hasta el momento la mayoría de las producciones de proteínas recombinantes que se realizan con el uso de las bacterias como biofábricas, utilizan la estrategia de expresar estas proteínas al citoplasma celular, donde pueden formar grandes agregados conocidos como cuerpos de inclusión, los cuales son generalmente insolubles. Aunque es reconocido que el empleo de medios de cultivo más ricos en nutrientes puede dar lugar a la obtención de proteínas solubles en el citoplasma celular (Moore y col., 1993). Sin embargo, el carácter oxidante del citoplasma bacteriano, generalmente no brinda las condiciones requeridas para que ocurra un correcto reordenamiento de las proteínas, sobre todo de aquellas que requieren de la formación de puentes disulfuros, como es el caso de los fragmentos de anticuerpos. Debido a ello después que el fragmento se extrae del citoplasma bacteriano se hace necesario someter la proteína a un proceso de plegamiento *in vitro* para que adquiera su forma activa. Este procedimiento tiende generalmente a comprometer el rendimiento final (Sánchez y col., 1999).

El estudio de las bacterias como sistemas para producir proteínas ha permitido acumular evidencias que permiten asegurar que es posible un correcto plegamiento de los fragmentos de anticuerpo en el espacio periplasmático, donde los fragmentos siguen una vía de ensamblaje

similar a la que ocurre durante la producción de Ac completos en el retículo endoplasmático de una célula B (Plückthun y col., 1996). En este sentido se ha demostrado ampliamente que fragmentos de anticuerpos extraídos directamente del periplasma celular pueden ser biológicamente activos (Skerra y Plückthun, 1988; Plückthun y col., 1996). No obstante, el éxito de esta alternativa para la expresión de los fragmentos de anticuerpos dependerá de la secuencia nucleotídica de cada anticuerpo en particular.

En la actualidad se han desarrollado métodos que permiten obtener buenos rendimientos de estos procesos de expresión (Arbabi-Ghahroudi y col., 2005).

El fragmento anti-CEA M3, se expresó de forma soluble al periplasma bacteriano mediante la utilización de un péptido señal proveniente de *Erwinia carotovora* llamado pelB. Para facilitar la expresión y acumulación del fragmento de anticuerpo en el espacio periplasmático se le adicionaron a los medios de cultivos, los reactivos, sorbitol y betaína, que son compuestos de bajo peso molecular, modificadores de la osmolaridad y que ayudan a la bacteria *E. coli* a crecer bajo condiciones de estrés osmótico (Barth y col., 2000). Estos autores demostraron que cuando empleaban en el medio de cultivo de *E. coli* 4% de NaCl, 0,5 mol/L de sorbitol y 10 mmol/L de betaína obtenían un 95% de proteínas funcionales acumuladas en el periplasma celular, en contraste con menos del 10% obtenido en condiciones estándar de cultivo donde no se emplean estos compuestos.

Después de comprobar la secuencia nucleotídica del fragmento anti-CEA se introdujo en la cepa de *E. coli* RV 308 para su expresión. Esta cepa, según estudios descritos anteriormente (Horn y col. 1996), ha sido empleada con éxito en la producción de fragmentos de anticuerpos y se caracteriza por permitir cultivos de alta densidad celular al producir bajas cantidades de acetato sin la acumulación concomitante de niveles significativos de ion-acet, el cual es uno de los componentes que pueden reducir el crecimiento del cultivo (Horn y col., 1996).

La obtención en nuestro trabajo de una expresión total en biomasa cercana al 30% de las proteínas es similar a la obtenida por Ren y col., en el 2001 al expresar un fragmento de anticuerpo de simple cadena en el periplasma de la cepa de *E. coli* BL21 (coden plus), estos mismos autores también describen expresiones para su fragmento de entre 5-10% y 15-20% del total de proteínas en las cepas de *E. coli* JM109 (DE3) y BL21 (DE3) respectivamente. Esta expresión representó uno de los mayores valores alcanzado para el fragmento anti-CEA en nuestras condiciones de cultivo.

Al gen que codifica para el fragmento de anticuerpo le fue incorporado en el extremo carboxilo terminal un péptido etiqueta que permitió la inmunoidentificación de la proteína durante la expresión y la purificación, corroborando la importancia y utilidad del uso de estas secuencias, tal y como había sido demostrado y recomendado por Kolodziej y Young en 1991.

Además, la adición de una secuencia nucleotídica para la síntesis de seis histidinas en la zona carboxilo terminal, permitió la purificación de la proteína mediante la afinidad a iones

metálicos. Tanto la pureza obtenida, el costo de la matriz y lo sencillo del método hacen que esta sea la opción más conveniente para la producción a mediana escala de esta proteína, reafirmando los resultados alcanzados por Lichty y col. en 2005, los cuales después de comparar 8 péptidos diferentes para la purificación por afinidad de extractos de *E. coli*, levadura, *Drosophila* y células HeLa demostraron que se obtenía una mejor relación costo-beneficio al realizar la purificación usando la cola de histidinas y la matriz Ni-NTA. Por tal motivo ellos recomiendan la afinidad por las histidinas para la producción de grandes volúmenes de proteínas provenientes de bacterias. Finalmente la ubicación de este péptido en la secuencia proteica es útil ya que permite usarlo también como blanco para dirigir el marcaje radioactivo mediante métodos directos, en caso de que se requiera conjugar la proteína con isótopos radioactivos como el ^{99m}Tc ó el $^{186/188}\text{Re}$ (Waibel y col., 1999).

El uso de la prensa de French como método de ruptura fue útil desde el punto de vista práctico al incrementarse el volumen de cultivo y además con el fin de aumentar la eficiencia de este proceso. El empleo de este método provocó un aumento en las cantidades de proteínas totales presentes en el sobrenadante de ruptura y por consiguiente también un aumento de la cantidad de proteínas unidas inespecíficamente a la matriz. Estas proteínas se removieron con el tampón de lavado y concentraciones de imidazol de 50 y 25 mmol/L, sin que estas condiciones de lavado comprometieran la pureza final. El alto porcentaje de pureza obtenido al eluir las proteínas pegadas en la matriz demostró la factibilidad de emplear este método para extraer y purificar el fragmento anti-CEA M3, contrario a los resultados descritos por Das y col., 2005, en los cuales informan sobre la obtención de bajos porcentajes de pureza en IMAC al coeluir proteínas del hospedero conjuntamente con el fragmento de simple cadena anti-CD19-c-myc-His₆-Cys.

Se describe en la literatura que en este tipo de purificaciones la elución de las proteínas se puede realizar mediante variaciones de pH o por competencia con imidazol (Hochuli y col., 1987; Hoffmann y Roedor, 1991). En nuestro caso utilizamos la competencia con el imidazol debido a que es una forma menos agresiva que la variación por pH y disminuye el riesgo de precipitación de las proteínas. Las pérdidas de fragmento observadas durante el lavado de la matriz con 50 mmol/L de imidazol pueden ser debido a la pobre exposición de las histidinas en un grupo de los fragmentos extraídos, lo cual implica una menor interacción de estos fragmentos con los iones de Ni^{2+} presentes en la matriz, aspecto que ya había sido previsto por Hoffmann y Roedor, 1991.

El razonamiento anterior está sustentado por el hecho de que al utilizar una menor concentración de imidazol durante el lavado fue posible incrementar prácticamente tres veces el rendimiento final del proceso, sin comprometer la pureza final durante la elución. El rendimiento alcanzado al final de la purificación por IMAC para el fragmento anti-CEA es superior a los 5 mg/L logrado por Asvadi y col. 2002, con un fragmento dimérico contra el RhD humano que se

expresó al periplasma y se purificó por Ni-NTA, y además, mayor al rendimiento final alcanzado por Das y col., 2005 con un fragmento de simple cadena anti-CD19-c-myc-His₆-Cys donde obtuvieron de 100 a 300 µg/L de cultivo. Sin embargo, el rendimiento obtenido al final de la purificación por gel filtración del fragmento dimérico anti-CEA M3 es muy inferior al reportado por Horn y col. 1996, para un mini anticuerpo que es expresado en la cepa de *E. coli* RV 308 cultivada a alta densidad celular cuando obtienen un rendimiento de 4,1 g/L, el más alto reportado hasta el momento para un fragmento expresado en el periplasma bacteriano. Al ser obtenido este resultado con un vector parecido al nuestro y en la misma cepa debemos explorar el aumento de la expresión unido al incremento de la densidad celular, aunque los resultados finales estarán en dependencia de las secuencias específicas de cada anticuerpo.

5.2 Análisis de la conformación del fragmento anti-CEA M3.

No obstante el alto porcentaje de pureza de las proteínas obtenidas en la elución del IMAC, durante un segundo paso de purificación mediante cromatografía de exclusión molecular se observó la elución de 2 proteínas que según la calibración previa de la columna correspondieron a las formas monomérica y dimérica del fragmento. Debido a que la conformación multimérica del fragmento anti-CEA se alcanza mediante uniones no covalentes que pueden ser rotas con pequeños cambios de temperatura o fuerza iónica, durante las electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras el fragmento eluido siempre se observó como una banda única que migró a una talla molecular correspondiente a un fragmento monovalente, además producto de que el punto isoeléctrico de esta proteína es cercano a un valor neutro no fue posible en nuestras condiciones realizar una electroforesis nativa. Por esta razón la estimación del peso molecular de cada fracción se realizó con el empleo de la cromatografía de exclusión molecular.

En nuestros experimentos, durante la cromatografía de exclusión molecular, no se observaron fragmentos con conformaciones de talla superior a 60 kDa, lo cual difiere de los resultados descritos por Kortt y col. 2001, que además de la fracción dimérica reportan la formación de trímeros y tetrámeros al expresar y purificar un fragmento del anticuerpo anti-neuraminidasa NC10 conformado con un péptido de unión de 5 aminoácidos entre las regiones variables.

El empleo de 5 aminoácidos en el péptido que une a las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se seleccionó con el fin de evitar el reordenamiento entre las regiones variables de una misma cadena, y de esta forma facilitar la búsqueda de la estabilidad molecular mediante la unión no covalente entre dos cadenas idénticas, donde la V_H y la V_L de una cadena se acoplan a la V_L y la V_H de la otra cadena respectivamente tal y como fue demostrado por Holliger y col. en 1993, cuando construyeron por esta vía un fragmento divalente y biespecífico a partir de los anticuerpos NQ11 y D1.3 anti hapteno de la feniloxazolona y anti lisozima de huevo.

La manipulación del tamaño del péptido de unión entre las regiones variables de un anticuerpo con el fin de obtener estructuras multiméricas está ampliamente documentada, se describe que basta reducir el péptido de unión a 3 ó 5 aminoácidos, para obtener fragmentos predominantemente divalentes. Desplancq y col., 1994 describen el análisis en FPLC de varios fragmentos de simple cadena con péptidos de unión entre 0 y 10 aminoácidos en los cuales además de dímeros obtienen una pequeña cantidad de monómeros, por su parte Atwell y col., 1999 demuestran que basta con reducir el péptido de unión de 3 a 2 residuos de glicina para provocar la transición de dímero a trímero.

Las proporciones entre las conformaciones diméricas y monoméricas obtenidas al final de cada proceso, puede depender además de una serie de factores como son: las condiciones de cultivo, el pH, la concentración de sales del tampón de extracción y de purificación, la concentración de proteínas y la presencia o ausencia de antígeno, como fue demostrado por Arndt y col., 1998, al estudiar el efecto de estos factores sobre el equilibrio dímero-monómero de un fragmento de simple cadena específico a fosforilcolina y con un péptido de unión de 15 aminoácidos entre las regiones variables.

En el caso del fragmento anti-CEA, sin estar concebido igual al fragmento descrito por Arndt y col., y teniendo en cuenta que las mayores proporciones obtenidas son de pico 2 (monómero a juzgar por los resultados de la gel filtración), se decidió experimentar el posible efecto del pH y la concentración de sales sobre las proporciones entre los picos 1 y 2 de la elución por gel filtración. Se demostró que ligeros cambios de pH no son suficientes para alterar la correlación entre los dos picos del fragmento M3. Sin embargo, la fuerza iónica si es un parámetro crítico, pues al bajar la concentración de sales todos los fragmentos tienden a aumentar el tiempo de retención eluyendo con un peso molecular cercano a la conformación monomérica, tal y como demostraron Arndt y col., 1998, confirmándose la importancia de la fuerza iónica para mantener las interacciones hidrofóbicas que estabilizan la estructura multimérica.

La reproducibilidad de las proporciones entre ambos fragmentos con independencia del tampón de ruptura y extracción, así como la estabilidad demostrada una vez purificada ambas conformaciones sugieren que la estructura dimérica del fragmento anti-CEA M3 se produce desde el momento de la expresión y acumulación en el periplasma bacteriano. Está descrito por varios autores (Atwell y col., 1999; Le Gall y col., 1999; Dolezal y col., 2000) que la forma final en las conformaciones de los fragmentos puede ocurrir desde el momento mismo de la expresión celular o durante los procesos de extracción y/o purificación.

Arndt y col., 1998 describen la conformación completamente dimérica de un fragmento de simple cadena formado con un péptido de unión de 15 aminoácidos cuando es expresado en el periplasma de la bacteria, en contraste con el 10-20% de dímero obtenido cuando este mismo fragmento es expresado como cuerpo de inclusión y ensamblado *in vitro*. Ellos plantean que la

alta concentración de la proteína durante el ensamblaje en el periplasma juega un rol crítico en la formación del dímero, se estima que la concentración en el periplasma es 500 veces mayor que la lograda en sistemas de ensamblajes *in vitro* (Arndt y col., 1998).

Con el objetivo de estudiar y comparar las conformaciones del fragmento anti-CEA se construyó y expresó un nuevo fragmento donde se unieron las regiones variables del anticuerpo CB/iorCEA.1 con un péptido de unión de 15 aminoácidos (L15). En los estudios de gel filtración se demostró que este fragmento eluye con un tiempo de retención correspondiente a un fragmento con estructura monomérica, aunque ligeramente menor que el pico 2, lo cual puede ser debido a las condiciones de reordenamiento propio de esta molécula, posiblemente producto a que adquiere una estructura molecular más compacta.

En el cálculo del coeficiente de absortividad específica (a_s) se obtuvieron valores similares entre el pico 2 y el L15, los cuales presentan la misma constante de absortividad molar, mientras que para el pico 1 se obtuvo un valor muy cercano al valor teórico previsto para el dímero. Teniendo en cuenta que el a_s puede variar de acuerdo a la exposición estructural de los cromóforos triptófano, tirosina y cisteína en la proteína, como describen Yanari y Bovey, 1960 y Brandts y Kaplan, 1973 y además que estos residuos en una molécula globular, como son los fragmentos de anticuerpos, pueden estar hacia su interior y por lo tanto absorber menos luz a una longitud de onda de 275 nm comparados con una estructura más relajada (Lesser y Rose, 1990), podemos esperar que si la estructura 3D del fragmento dimérico es más compacta su a_s sea menor que para el resto de los fragmentos. Los resultados obtenidos demuestran que aunque el pico 1 y el pico 2 presentan igual secuencia primaria son estructuralmente diferentes, y existe mayor semejanza entre el pico 2 y el L15.

Otro de los experimentos realizados como parte de los estudios de conformación fue la difracción dinámica de luz, la cual permite la medición de tallas en partículas menores de 1 nm de diámetro y ha sido utilizado para caracterizar proteínas en solución (Wyatt, 1993). En el caso de las inmunoglobulinas y otras moléculas semejantes a anticuerpos, aunque no se ha usado para medir el peso molecular real de los mismos, constituye una herramienta válida para analizar la homogeneidad de las muestras y comparar la talla molecular relativa entre muestras con diferentes conformación (Ahrera y col., 2003). Como se aprecia en la tabla 7, los pico 2 y L15 tuvieron igual comportamiento en cuanto al tamaño de las partículas distribuidas (R), mientras este valor fue diferente para el pico 1. Después de los cálculos el valor del peso molecular obtenido para el pico 1 fue prácticamente el doble de los estimados para los pico 2 y L15.

Estos experimentos brindan elementos que apoyan en la práctica el criterio de la existencia de dos conformaciones del fragmento anti-CEA.

Mediante la espectrometría de masa con el análisis de péptidos tripticos por LC-MS se confirmó experimentalmente la secuencia aminoacídica de la proteína y la existencia de los puentes disulfuros, sin embargo por este método no fue posible definir la estructura dimérica del

fragmento, al estar formado el dímero por dos unidades idénticas que se unen mediante enlaces no covalentes. Lo anterior lo confirmó el hecho de que la masa molecular experimental alcanzada se diferenció muy poco de la masa teórica esperada para el fragmento de cadena única.

5.3 Estudio de la especificidad y actividad biológica del fragmento anti-CEA M3.

Después de obtener el fragmento anti-CEA M3 fue necesario determinar su especificidad al CEA, comparando con el anticuerpo monoclonal de origen CB/iorCEA.1 (Tormo y col., 1989). Este anticuerpo al ser generado se evaluó tanto para el CEA como para los antígenos no relacionados NCA (antígeno no específico de reactividad cruzada) y BGP (glicoproteína biliar) descritos por von Kleist y col., 1972 y Svenberg y col., 1979 respectivamente.

Es conocido que el CEA forma parte de una gran familia de moléculas con estructuras muy parecidas y que los anticuerpos obtenidos contra una de ellas pueden presentar reconocimiento entrecruzado con las otras (Hammarström, 1999). En el ensayo ELISA realizado quedó demostrado que el fragmento reconoce al CEA humano y no a la BSA que se usó como antígeno no relacionado. La diferencia en los valores de absorbancia que se observan entre el anticuerpo y el fragmento, son debidas al empleo de un anticuerpo policlonal generado contra el anticuerpo monoclonal, que se usó como segundo anticuerpo en la reacción, este reactivo, por ser de carácter policlonal, puede reconocer las regiones constantes del anticuerpo que están ausentes en el fragmento.

La comparación de las afinidades entre el fragmento anti-CEA M3 y el anticuerpo CB/iorCEA.1, permitió comprobar que la avidéz de ambos por el antígeno es muy similar al obtenerse valores de afinidades muy cercanos, este resultado sugiere que el fragmento presenta dos sitios de unión al antígeno al igual que el anticuerpo completo, siendo un elemento más que puede definir la característica dimérica del mismo. Los valores de K_a obtenidos para el fragmento anti-CEA M3 tanto por el método de ELISA como por el BIAcore se encuentran en los límites superiores de los estimados que reportan Adams y col. 2001, como valores apropiados cuando se trata de moléculas pequeñas de anticuerpos cuya utilidad sea la radioinmunoterapia. Ellos demostraron que los fragmentos de anticuerpos con afinidades por encima de 1×10^9 (mol/L)⁻¹ podían presentar serías limitaciones de difusión intratumoral al quedar fuertemente unido al antígeno presente en las células tumorales de la periferia del tumor dando lugar a parches que impiden la penetración hacia las células más internas, además las altas afinidades pueden provocar acumulaciones de los fragmentos en sitios inespecíficos del organismo y limitar la localización tumoral (Saga y col., 1995), por tales motivos se recomienda usar en la radioinmunoterapia fragmentos con afinidades cercanas o menores que este valor. El fragmento anti-CEA M3 radiomarcado presentó una afinidad de 10^9 (mol/L)⁻¹ que lo sitúa en los límites de estos valores.

Los resultados positivos obtenidos al usar el pico 2 en el ensayo de citometría de flujo estimularon la realización de una serie de experimentos como se explicó anteriormente, debido que se aparta de lo planteado en la literatura para este tipo de fragmentos. Considerando la gran cantidad de información que indican la imposibilidad de que moléculas monoméricas formadas a partir de preparaciones de fragmentos con 5 aminoácidos en el péptido de unión (como el caso del pico 2) sean capaces de reconocer a su antígeno, debido a las restricciones que le impone el tamaño del péptido para recrear el sitio de unión (Atwell y col., 1999; Le Gall y col., 1999; Dolezal y col., 2000; Kortt y col., 2001; Power y col., 2003; Le Gall y col., 2004). Incluso si en nuestro caso nos propusiéramos considerar que los dos últimos aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y los dos primeros de la región variable de la cadena ligera aportaran de alguna manera en la formación del péptido de unión, aún no se dispondría de la cantidad de aminoácidos necesaria para permitir el reordenamiento correcto de ambas regiones variables, para lo cual se necesitan no menos de 12 aminoácidos, como demostraron Holliger y col. 1993 y Atwell y col. 1999, basados en evidencias cristalográficas y de microscopía electrónica.

En el contexto de estos resultados hay dos posibles explicaciones, una de ellas es que ambos picos (el 1 y el 2) sean dos fragmentos diméricos formados con diversos apareamientos de las moléculas monoméricas, o incluso que el pico 1 realmente sea un trímero y el pico 2 sea el dímero y que debido a que adquieren estructuras más compactas migran en la cromatografía de gel filtración como moléculas de menor talla. Otra posibilidad es que cuando se encuentre en presencia del antígeno las moléculas monoméricas sean capaces de unirse entre ellas favoreciendo la dimerización. Esta teoría está demostrada por Arndt y col. 1993 y Huang y col. 2005 en experimentos separados realizados con fragmentos de simple cadena y péptidos de unión de 15 o más aminoácidos, sugiriendo que la presencia del antígeno puede ser un factor importante para mantener y estabilizar la estructura dimérica de estas moléculas.

Como parte del estudio de estas conformaciones se hace necesario realizar experimentos de cristalización de los picos 1 y 2, ya sean puros o como parte de inmunocomplejos con el antígeno, que demuestren estas teorías.

5.4 Producción y Formulación del fragmento anti-CEA M3.

El objetivo de establecer un proceso productivo con vista a obtener el fragmento anti-CEA M3 con la calidad necesaria para el desarrollo de un ensayo clínico se logró al quedar diseñado los procedimientos para la fermentación a escala de 5 litros, la purificación, la formulación y la estimación de todos los parámetros de calidad cuyo resultado final es la obtención de un producto con calidad inyectable, tal y como lo describe Richter y col., 2004 para los anticuerpos.

La adición en la formulación final del producto de 5 mmol/L de EDTA se realizó al observar en las electroforesis de poli(acrilamida) la disminución de la talla del fragmento en aquellas muestras incubadas a 4°C y luego de comprobar mediante secuencia de aminoácidos y *Western*

blotting que esta disminución era provocada por una degradación que se producía en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Sanchez y col., 2007). Además teniendo en cuenta de que en la literatura se informa que en los extractos de *E. coli* es frecuente la existencia de metaloproteasas que pueden provocar la degradación de una parte de las proteínas producidas (Nieba y col., 1997). La formulación liofilizada fue la que mayor estabilidad demostró y además se seleccionó con el fin de facilitar la conformación de las dosis y de evitar condiciones engorrosas de almacenamiento y transportación del producto.

Los estudios de estabilidad demostraron un periodo de 6 meses de estabilidad de la proteína, durante el cual se cumplieron con todas las especificaciones de calidad establecidas.

5.5 Radiomarcaje del fragmento anti-CEA M3 con yodo y experimentos de estabilidad y biodistribución.

Para la utilización de fragmentos de anticuerpo en la radioinmunoterapia del cáncer, es de vital importancia la adecuada selección del radionúclido, los cuales deben ser relativamente baratos y poseer perfiles de desintegración apropiados (Zimmermann, 2007). El radioisótopo se escoge teniendo en cuenta una serie de consideraciones en cuanto a sus propiedades químicas, las cuales determinarán la facilidad con que se forma el radioinmunoconjugado con el anticuerpo y la fortaleza de este enlace (Sharkey y col., 2005).

En nuestro trabajo se seleccionaron los isótopos ^{125}I y ^{131}I para el marcaje del fragmento anti-CEA M3. Ambos isótopos han sido ampliamente usados en medicina nuclear tanto para el diagnóstico como la terapia (Zimmermann, 2007). El ^{125}I emite rayos gamma con fotones de baja energía (27 keV) que pueden ser captados en un contador de centelleo gamma, presenta un tiempo de vida medio de 60 días, y es muy usado en los experimentos preclínicos con animales y en el tratamiento de algunos tumores empleando la braquiterapia (Divgi, 1996).

El ^{131}I por su parte emite rayos gamma de alta energía (364 KeV) y presenta un complejo esquema de decaimiento que incluye emisiones β^- ; este isótopo es ideal para el diagnóstico y la terapia del cáncer y ha sido usado en una gran cantidad de ensayos clínicos con anticuerpos marcados (Divgi, 1996, Zimmermann, 2007).

Los métodos de unión del yodo radioactivo a los anticuerpos son procesos relativamente simples y generalmente permiten la obtención de elevados rendimientos radioquímicos y elevadas actividades específicas sin afectar la actividad biológica de la biomolécula (Oyen y col., 2007; Zimmermann, 2007).

El método de la cloramina T empleado para el marcaje del fragmento anti-CEA M3 con el yodo radioactivo fue descrito por McConahey y col., en 1966, este método junto con el del IodoGen son los más empleados para el marcaje directo de anticuerpos y fragmentos con yodo, los dos métodos se caracterizan por dirigir el marcaje hacia las tirosinas presentes en la molécula (Eary y col., 1988).

A pesar de que la cloramina T es más oxidante que el IodoGen y puede provocar mayor degradación de la proteína, su empleo es más sencillo y económico y permite lograr buenos resultados de marcaje, tal y como lo demuestran los resultados reportados por Huang y col., 2004 y Stein y col., 2005 cuando lo emplearon para el marcaje de sus fragmentos de anticuerpo.

El porcentaje de eficiencia obtenido durante los marcajes del fragmento anti-CEA M3 con cloramina T tanto para el ^{125}I como para el ^{131}I se encontraron por encima del 90%, resultados que están muy por encima para los reportados en la literatura para este método y semejantes a los reportados por Goel y col., 2001 y Olafsen y col., 2004, los cuales emplearon el método del IodoGen.

Como quedó demostrado durante las cromatografías en FPLC el radiomarcaje del fragmento con yodo no provocó cambios en el perfil de elución ni degradación de la proteína, inclusive para marcajes con una alta actividad de ^{131}I , que supuestamente podría provocar afectaciones por radiólisis en la molécula.

Los estudios de estabilidad de la molécula radiomarcada demuestran que el fragmento con baja actividad específica de ^{131}I es estable en suero humano o PBS por más de 72 horas. Sin embargo, para preparaciones de alta actividad específica una rápida degradación fue observada, con una pérdida de un 54% del radioyodo en buffer fosfato salino y suero humano. Estos resultados muestran una dependencia de la estabilidad con la actividad específica y/o la concentración radiactiva como resultado de una degradación autoradiológica. La solución a este fenómeno ha sido uno de los retos que ha presentado el desarrollo de los radiofármacos terapéuticos y varias estrategias han sido trazadas para superarlo. Uno de ellos son los llamados basureros o atrapadores de radicales libres (*scavengers*), tales como el ácido ascórbico, el ácido genticónico o algunos alcoholes, sugeridas por Liu y col., 2001 y Jain y col., 2003 para este tipo de moléculas, los cuales disminuyen este efecto de radiólisis.

La determinación de la fracción inmunorreactiva de los anticuerpos radiomarcados constituye uno de los parámetros más importantes a evaluar durante el control de calidad que se realiza antes de la administración, pues para las aplicaciones *in vivo* la existencia en la preparación de una fracción significativa no reactiva de anticuerpos radiomarcados, representa un problema adicional debido a la dosis de radiación no específica que podría provocarse durante los tratamientos (Lidmo y col., 1984).

La vía convencional para determinar la fracción inmunorreactiva de un anticuerpo es mediante el análisis de la cantidad de anticuerpo radiomarcado que es capaz de quedar unido en condiciones de exceso de antígeno. Lidmo y col., 1984 desarrollaron un nuevo método basado en una modificación del graficado de Lineweaver-Burk donde determinan la fracción inmunorreactiva mediante una extrapolación lineal de la unión del anticuerpo en presencia de un exceso infinito del antígeno.

Para calcular la inmunorreactividad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹²⁵I, empleamos en nuestro trabajo el método propuesto por Lidmo y col. 1984, que consiste en determinar la fracción de anticuerpo inmunorreactiva mediante la extrapolación lineal de la unión a un exceso infinito de antígeno. En este caso se asumió que la concentración del antígeno expresado en las células es una buena aproximación de la concentración de antígeno libre.

La fracción inmunorreactiva estimada para el fragmento y el anticuerpo, resultaron más pequeñas que las obtenidas en el trabajo por Lidmo y col. 1984, empleando células en suspensión y el anticuerpo 9.2.27 anti-antígeno de superficie de melanoma, radiomarcado con una alta actividad específica de ¹²⁵I. También fue menor que las reportadas por Clarke y col. 2000 para el anticuerpo humanizado 3S193 anti-Le^Y, radiomarcado con ¹²⁵I. Ambos autores utilizaron para el marcaje el método de cloramina T, y sus valores estuvieron cercanos al 50% de inmunorreactividad. Estas diferencias podrían ser producto del empleo de células fijadas a la placa, donde es muy difícil de controlar la concentración de células que finalmente quedan en cada pozo, además de ser posible que las muestras requieran de un mayor tiempo de incubación con el fin de que la reacción de unión de los anticuerpos alcancen los valores de equilibrio, siendo éste uno de los parámetros importante a considerar en estas reacciones según describen Lidmo y col. 1984.

El resultado de nuestro experimento, se interpreta mediante la comparación entre la inmunorreactividad del fragmento y la del anticuerpo completo usado en el mismo experimento, debido a las limitaciones que presenta este método en cuanto al número de células, y por ende la cantidad de antígenos presentes (Lidmo y col. 1984).

Para determinar la inmurreactividad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ¹³¹I, decidimos emplear el método descrito por Wu y col., 1999. Mediante este método se obtuvieron valores por encima del 80% de fracción inmunorreactiva, similares a los reportados por Liersch y col., 2005 cuando procedieron al marcaje radioactivo del anticuerpo Labetuzumab con ¹³¹I mediante la cloramina T, o también a los reportados por Olafsen y col., 2004 para el fragmento del anticuerpo p185^{HER-2} y para un fragmento del anticuerpo anti-CEA T84.66. Ambos marcados con ¹³¹I, con el método de lodogen.

Varios autores, entre ellos Eary y col., 1988; Nikula y col., 1995 y Olafsen y col., 1996 plantearon la posibilidad de que el marcaje radioactivo de un anticuerpo a través de las tirosinas pudiera ser un elemento negativo debido a que se puede alterar la estabilidad de la molécula y eliminar o disminuir su especificidad por el antígeno. Sin embargo, los índices de inmunorreactividad para el fragmento anti-CEA M3 obtenidos en nuestro trabajo demuestran que los marcajes con estos isótopos no producen afectaciones en su estructura, a pesar de que presenta 10 tirosinas que forman parte de los CDR en las regiones variables. Algunas más que las reportadas para los anticuerpos Labetuzumab y T84.66 que cuentan con 6 y 7 tirosinas respectivamente (Liersch y col., 2005, Olafsen y col., 2004).

La medición de la constante de afinidad después del marcaje radioactivo también constituye un parámetro para confirmar la calidad del anticuerpo radiomarcado. Los valores de afinidad estimados simultáneamente para el fragmento y el anticuerpo completo radiomarcados sobre células fijadas a una placa demuestran que ambas moléculas no sufren grandes cambios en su estructura durante el marcaje radioactivo.

La afinidad del fragmento radiomarcado con ^{125}I calculada por este método fue 100 veces menor a la obtenida por el BIAcore para la molécula sin marcar, aunque este valor de afinidad también puede estar influenciado por el método de las células fijadas a placas empleado en este estudio.

El resultado obtenido para el fragmento anti-CEA M3 fue completamente inverso a lo alcanzado por Pavlinkova y col. 1999 al describir durante su análisis en el BIAcore un valor de 10^7 M^{-1} para la K_a del fragmento dimérico del anticuerpo anti-TAG-72 nombrado CC49, lo que representó un valor 100 veces menor que el obtenido por el análisis de Scatchard.

El valor de afinidad del fragmento anti-CEA M3 marcado con ^{125}I también es menor comparado con el de Lidmo y col. 1984 para el anticuerpo monoclonal 9.2.27, cuyos valores son de 10^9 M^{-1} . Sin embargo, es comparativamente similar a los 10^7 M^{-1} reportados por Clarke y col. 2000 para el anticuerpo humanizado 3S193 anti-Le^Y radiomarcado con ^{125}I con el método de cloramina T. En otro reporte, Tahtis y col. 2001 señalan valores de afinidad para el fragmento dimérico del anticuerpo humanizado anti-Le^Y 3S193 radiomarcado con ^{125}I de 10^6 M^{-1} , unas 10 veces inferiores al anticuerpo completo, y señalan como causa probable, la baja inmunorreactividad y la inestabilidad mostrada por la molécula *in vitro* al ser incubada en plasma durante 16 h a 37°C .

No obstante, a las diferencias encontradas entre las afinidades del fragmento anti-CEA M3 no marcado y radiomarcado con ^{125}I , los valores obtenidos se encuentran dentro de los descritos por Adams y col., 2001 para ser aceptables de anticuerpos con objetivo de emplearse en la radioinmunoterapia. Ellos demuestran en su trabajo que anticuerpos y fragmentos con afinidades entre 10^6 M^{-1} y 10^9 M^{-1} pueden lograr una alta acumulación y penetración tumoral. Previamente, Fujimori y col., 1990 han diseñado un modelo matemático donde demuestran la importancia que tiene la afinidad para el uso exitoso de los anticuerpos monoclonales radiomarcados.

Experimentos *in vivo* con el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{125}I empleando ratones sanos fueron llevados a cabo con el fin de demostrar mediante la biodistribución, que el fragmento radiomarcado no se acumulaba inespecíficamente en ninguno de los órganos vitales del animal. A las 24 horas de administrado el fragmento radiomarcado ya había sido prácticamente eliminado el mismo, por lo que quedaba demostrado que el acúmulo inespecífico o reacción cruzada era mínimo.

En los ratones atímicos xenotransplantados con las células LS 174T e inyectados con el fragmento anti-CEA M3 marcado con ^{125}I , los patrones de biodistribución durante todo el experimento mostraron una tendencia similar a la descrita en la literatura cuando se utilizan este tipo de moléculas y el mismo modelo animal. En estos se observó una rápida eliminación del producto de la circulación y una mayor acumulación del fragmento en el tumor comparado con el resto de los órganos durante los tres períodos de tiempo examinados. El porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido presente en el tumor a las 24 horas de la inyección, en nuestros experimentos, demostraron una rápida acumulación tumoral, aunque fue ligeramente inferior si comparamos con los 5,62% y 4,56% reportados por Pavlinkova y col. 1999 y Wu y col. 1999 para los fragmentos dimérico del anticuerpo anti-TAG-72, CC49 y anti-CEA, T84.66, radiomarcados con ^{125}I y ^{123}I respectivamente, e inyectados en el mismo modelo animal.

Nuestros valores estuvieron más cercanos a los informados por Wu y col. 1996 cuando usaron la fracción dimérica del fragmento scFv/212 caracterizado por tener un péptido de unión de 14 aminoácidos. Este fragmento se realizó a partir del anticuerpo anti-CEA T84.66 en un formato V_L -L- V_H y con él se obtuvo un 3,89% de %ID/g a las 24 horas de la administración. La fracción monomérica de este mismo fragmento dio un valor de 0,94% de %ID/g en este intervalo de tiempo, lo que puede ser debido a una menor avidéz por el antígeno y al menor tiempo de residencia en sangre de este inmunoconjugado.

El decrecimiento de los %ID/g en el tumor entre las 24 y las 48 horas para el fragmento anti-CEA M3 fue de 1,85%, menor que los reportados para el fragmento del anticuerpo CC49 y para la fracción dimérica del fragmento scFv/212 del T84.66 con valores de 2,3 y 2.65% respectivamente (Wu y col. 1996; Pavlinkova y col. 1999), lo que significa una mayor permanencia del fragmento anti-CEA M3 en el tumor. Los resultados presentados en la tabla 10 demuestran además que es a las 48 horas donde se obtiene los mayores acumulados de %ID/g en tumor con relación a la sangre al igual que reporta Wu y col. 1999 para el fragmento dimérico del anti-CEA T84.66 radiomarcado con ^{123}I . La alta relación de %ID/g observada en los valores entre el tumor y los órganos más vascularizados demuestran la acumulación específica del fragmento en el tumor. Por otra parte la disminución de esta relación en el caso de los riñones ratifica a este órgano como la principal vía de excreción.

Los experimentos de biodistribución del fragmento marcado con una baja actividad específica de ^{131}I también se realizaron en ratones atímicos xenotransplantados con las células LS 174T. En este experimento los %ID/g son mayores debido a que se administró a los animales una dosis mayor de radioactividad. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I se acumula rápidamente en el tumor, detectándose un pico máximo del %ID/g a las 2,5 horas de la inyección. Esta observación también fue realizada por Wu y col. 1999, cuando en la biodistribución de un fragmento dimérico del anticuerpo anti-CEA T84.66 radiomarcado con ^{123}I obtuvieron los máximos valores a las 2

horas de la administración del fragmento. Sin embargo, este mismo grupo de autores describen la obtención de una mayor acumulación (10,02 %ID/g) en el tumor a las 4 horas de la administración, cuando emplean un fragmento de anticuerpo dimerizado covalentemente mediante la incorporación de una cisteína en el carboxilo terminal de la molécula y radiomarcado con ^{131}I (Olafsen y col. 2004).

La retención del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado en el tumor fue superior al resto de los órganos durante todo el experimento, observándose en el tiempo un aclaramiento más lento que el obtenido con el isótopo ^{125}I , y también menor que lo reportado por Olafsen y col. 2004 para el fragmento del anticuerpo anti-CEA T84.66 dimerizado covalentemente con cisteína, aunque estos autores solo mantuvieron el experimento durante 24 horas.

Analizando la relación entre el tumor y el resto de los tejidos, así como los valores de %ID/g, el fragmento anti-CEA M3 mostró su mejor comportamiento a las 48 horas de la inyección. Las relaciones entre los valores de %DI/g en el tumor y el resto de los órganos más vascularizados demostraron una permanencia del fragmento en el tumor en la medida que se aclaraba del resto de la circulación sanguínea. Además, si se tiene en cuenta la relación entre el valor obtenido de %ID/g en el tumor y los órganos principales de excreción se confirma que la vía urinaria es la principal ruta de eliminación del fragmento radiomarcado, tal y como describe Wu y col. 1996 para este tipo de biomoléculas. Tanto el tamaño molecular del fragmento como la ausencia de región Fc hacen que la eliminación de la circulación sanguínea se produzca a través de los riñones, lo cual contribuye a la disminución del tiempo de vida media en sangre (Kenanova y col. 2005). En este sentido cuando trabajamos con fragmentos marcados radiactivamente es importante tener en cuenta el radioisótopo, ya que puede producirse un daño renal al irradiarse en exceso los riñones, un caso típico de esta situación es el ^{111}In cuya dosis se establece según el cálculo del posible daño renal que puede provocar este isótopo (Behr y col., 1998).

La elevada diferencia en la relación de los valores de %ID/g obtenidos entre el tumor con relación al resto de los tejidos es muy favorable para la obtención de imágenes contrastadas con la calidad necesaria y es muy útil para el futuro uso terapéutico del radiofármaco. La permanencia del fragmento radiomarcado en el tumor estará en dependencia de la especificidad, la valencia del mismo y la constante de afinidad, aspectos que pueden provocar una mayor penetración y retención tumoral como ya ha sido explicado.

La captación tumoral en ratones atómicos xenotransplantados con células LS 174T mediante la gammagrafía con el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con alta actividad de ^{131}I , corroboró los resultados anteriores de biodistribución cuando no se observó acumulación inespecífica en ningún órgano crítico.

5.6 Evaluación del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I en pacientes con cáncer colorectal.

Los resultados obtenidos en los estudios preclínicos avalaron las condiciones para que en el marco de un ensayo clínico fase I en pacientes con cáncer colorectal se procediera a evaluar el comportamiento farmacocinético, la biodistribución y la estabilidad en sangre del fragmento de anticuerpo anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I .

Las ventajas en las propiedades biológicas y farmacocinéticas de este tipo de molécula unido al poder terapéutico del ^{131}I , hace prever que pueda convertirse en un agente radioinmunoterapéutico y superar al anticuerpo completo de origen. El rápido aclaramiento sanguíneo de los fragmentos comparados con los anticuerpos completos humanos puede permitir el uso de altas Dosis Máximas Tolerables (DMT) sin afectación significativa del tejido hematopoyético (Pavlinkova y col. 1999) lo que unido a una adecuada biodistribución y velocidad de aclaramiento podría prolongar la retención en el tumor, minimizando las afectaciones resultantes de la actividad circulante.

Durante las evaluaciones realizadas en los primeros 5 pacientes incluidos en el ensayo clínico, con una dosis única de 0,3 mg del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I , no se detectaron eventos adversos, ni anticuerpos anti-fragmentos en el suero de los pacientes un mes después de la administración. Lo que representó una de las mayores diferencias encontradas con relación al anticuerpo completo, ya que Oliva y col. 2005 en el marco de un ensayo clínico Fase III, describen la presencia de respuesta HAMA en los pacientes con cáncer colorectal 15 días después de administrar 1 mg del anticuerpo CB/iorCEA.1.

En los análisis realizados en HPLC se demostró que la molécula mantenía su conformación dimérica a pesar de la alta dilución que sufre con la sangre del paciente. La dilución del fragmento anti-CEA M3 podía ser un elemento de inestabilidad tal y como demostraron Huang y col. 2005 con el dímero del fragmento 15-9 anti-laminin 1, el cual tiende a disociarse en monómero a concentraciones inferiores de 10 nM, lo que provoca una baja acumulación en el tumor. En nuestro caso, aún a las 24 horas después de la administración se observó la fracción correspondiente al fragmento eluyendo con el mismo tiempo de retención que el patrón. Estos resultados son superiores a los obtenidos por Wong y col. 2004 que observaron la presencia del minianticuerpo de 80 kDa derivado del anticuerpo anti-CEA T84.66 marcado con ^{125}I sólo hasta las 20 horas después de la administración.

Durante este estudio también se observó la formación de inmunocomplejos con el CEA circulante en una proporción mucho mayor que la reportada en su estudio por Wong y col. 2004, a pesar de que en nuestro caso son inferiores los niveles séricos del antígeno. Es conocido que el valor sérico del CEA en los pacientes de cáncer colorectal puede ser usado como criterio de pronóstico para la terapia, al existir una correlación entre este y el tamaño del tumor (Uehara y col., 2007).

En la preparación y administración del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I , no se utilizaron aditivos, tales como el ácido ascórbico, que pueden ayudar a incrementar la estabilidad de la molécula en sangre (Jain y col. 2003).

En el análisis de los parámetros farmacocinéticos se observó una curva bimodal para la distribución del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con las dos fases esperadas muy bien definida. El tiempo de vida media en la fase α fue muy superior al obtenido para el anticuerpo monoclonal CB/iorCEA.1 radiomarcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ durante un estudio clínico en pacientes con cáncer colorectal (Pimentel y col. 2004), debido posiblemente a que el anticuerpo completo tiende a acumularse rápidamente en compartimientos no deseados, tales como el hígado y la medula ósea lo que provoca un aumento en su eliminación. El fragmento sin embargo, demuestra una distribución más lenta durante las primeras horas de la administración, lo cual significa que es más homogénea y que no se acumula inespecíficamente. Sin embargo, el tiempo medio de la fase β entre el fragmento anti-CEA M3 y el anticuerpo monoclonal fue prácticamente el mismo si se tiene en cuenta la desviación estándar de la media (22 ± 4 horas para el AcM CB/iorCEA.1 y $20 \pm 6,9$ horas para el fragmento anti-CEA M3).

Es conocido que los anticuerpos monoclonales murinos presentan un tiempo de vida media en sangre menor que los anticuerpos humanos, como ha sido demostrado por Faxas y col. 2003 cuando informan un tiempo de vida media entre 13,93 y 19,6 horas para el AcM iorT1 al ser usado en un ensayo clínico en pacientes con linfoma T, o también el anticuerpo tositumomab, anti-CD20 para el cual se describe un tiempo de vida media entre 36 y 48 horas (Creus y col. 2002). El comportamiento de estos anticuerpos puede ser el resultado de la respuesta inmune que por lo general son capaces de activar cuando se administran en humanos. En el caso del fragmento anti-CEA M3 el tiempo de vida media en sangre al parecer estuvo regulado principalmente por el tamaño molecular, debido a la posibilidad de que un fragmento como este pueda ser filtrado por el glomérulo renal (Kang y col., 2000).

El tiempo de residencia media del fragmento anti-CEA M3 en los pacientes es menor que el reportado por Wong y col. 2004 para el minianticuerpo (80kDa) del anti-CEA T84.66 radiomarcado con ^{123}I , al describir el tiempo de residencia media para este fragmento de 28,9 horas. Este parámetro, sin embargo, depende mucho de cada paciente, tal y como lo demuestran las grandes variaciones observadas por Wong y col. 2004, cuando describen rangos de entre 10,9 y 65,4 horas para sus pacientes. En nuestro caso el tiempo de residencia medio también fue menor, debido igualmente a la menor talla molecular del fragmento anti-CEA M3 (55-60kDa), no obstante, se detectó igualmente una amplia variación entre pacientes.

En el caso de los fragmentos, otro factor que influye en la disminución del tiempo de residencia media es la ausencia de la región Fc de las inmunoglobulinas, esta parte de la molécula puede provocar la recirculación de los anticuerpos mediada por los receptores de Fc

neonatales, aunque se describe que en los humanos este mecanismo no contribuye al mantenimiento y la recirculación de las inmunoglobulinas de ratón (Kenanova y col. 2007).

A las 24 horas de la administración del fragmento anti-CEA M3 -¹³¹I se había eliminado en la orina prácticamente el 45% de la actividad inyectada, muy distante del 10% en 24 horas reportado por Gilmará y col. 2004 para el AcM CB/iorCEA.1 radiomarcado con ^{99m}Tc el cual debe ser procesado a través del metabolismo hepático. En nuestro ensayo a las 72 horas, la excreción en orina de la actividad inyectada era del 85,47%. Sin embargo, de esta actividad solo un 2,2% se encontraba asociada al fragmento de anticuerpo, por lo que estos valores correspondían sobre todo al yodo libre presente en la circulación y proveniente de la degradación del fragmento radiomarcado.

Analizando la cantidad de fragmento radiomarcado presente en el suero de los pacientes, se demostró que a las 72 horas de la inyección más del 50% del ¹³¹I presente en el suero estaba aún asociado a las proteínas.

Las imágenes obtenidas en la cámara gamma corroboran los resultados de la farmacocinética y demuestran un rápido aclaramiento del fragmento. A las 72 horas, no se observó acumulación inespecífica en ningún órgano crítico, incluyendo el hígado. Este hecho evidencia una de las grandes ventajas de la utilización del fragmento recombinante dimérico sobre su anticuerpo íntegro, administrado por vía parenteral en la radioterapia dirigida. Estos últimos muestran un acúmulo de alrededor del 9% DI en el hígado debido a mecanismos inespecíficos de metabolismos de proteínas (Gilmará y col., 2004).

A través de la gammagrafía se pudo demostrar el mantenimiento de la especificidad del fragmento anti-CEA M3 por su antígeno carcinoembrionario *in vivo*. Durante la gammagrafía, en la medida que fue disminuyendo el fondo de radioactividad de la circulación del paciente, la acumulación del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado en el tumor fue más evidente.

Los elementos aportados en estos ensayos dan evidencias de que el fragmento anti-CEA M3 puede ser superior al anticuerpo completo CB/iorCEA.1 en la radioinmunoterapia del cáncer, ya que en los pacientes estudiados no se presentaron eventos adversos, no se observó acumulación inespecífica en ningún órgano crítico y si en el tumor, no se produjo respuesta anti-fragmento M3 y se produjo una rápida eliminación del fragmento de la circulación sanguínea.

6. Conclusiones

1. El fragmento dimérico derivado del anticuerpo CB/ior CEA.1 se expresó al periplasma de *E. coli* de forma activa. El mismo se purificó con un alto grado de pureza mediante la combinación de IMAC y cromatografía de exclusión molecular. Se logró establecer un proceso productivo para el fragmento a escala de 5 L.
2. El fragmento dimérico anti-CEA M3 presentó una afinidad y especificidad por el CEA humano similares al anticuerpo completo, lo cual se demostró mediante los ensayos ELISA, Inmunofluorescencia y Citometría de flujo.
3. Se logró altos valores de marcaje del fragmento anti-CEA M3 con los isótopos radioactivos ^{125}I y ^{131}I por el método de la cloramina T. El fragmento radiomarcado es estable y mantiene la inmunorreactividad y afinidad por el antígeno similares al anticuerpo completo.
4. El fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con los isótopos ^{125}I y ^{131}I se acumuló específicamente en el tumor de los ratones xenotrasplantados con células tumorales humanas CEA positivas, y mantuvo una relación favorable al tumor al compararse con el resto de los órganos.
5. El fragmento anti-CEA M3 en dosis única de 0,3 mg no provocó efectos adversos en los pacientes estudiados y presentó características farmacocinéticas y de biodistribución superiores al anticuerpo completo. Resultados que sugieren su posible beneficio en la radioterapia del cáncer colorectal.

7. Recomendaciones

- Continuar con los estudios sobre la estructura molecular de los picos 1 y 2 provenientes de la purificación en gel filtración, en cuanto a la cristalización de las conformaciones.
- Estimar la afinidad del fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I y comparar con el anticuerpo completo, así como estudiar el efecto de captadores de radicales libres en la estabilidad de los preparados de alta actividad específica.
- Concluir el ensayo clínico con el fragmento anti-CEA M3 radiomarcado con ^{131}I y comparar todos los resultados con los datos que se tienen del anticuerpo completo.

8. Referencias

- Adair J.R. (1992) Engineering antibodies for therapy. *Immunol. Rev.* 130: 5-40.
- Adams G.P., McCartney J.E., Wolf E.J., Eisenberg J., Tai M.S., Huston J.S., Stafford W.F., III, Bookman M.A., Houston L.L., y Weiner L.M. (1995) Optimization of in vivo tumor targeting in SCID mice with divalent forms of 741F8 anti-c-erbB-2 single-chain Fv effects of dose escalation and repeated i.v. administration. *Cancer Immunol. Immunother.* 40: 299-306.
- Adams G.P., Schier R., McCall A.M., Simmons H.H., Horak E.M., Alpaugh R.K., Marks J.D., y Weiner L.M. (2001) High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain Fv antibody molecules. *Cancer Res.* 61: 4750-4755.
- Ades T., Benson A.B., Engstrom P.F., Kattlove H., McAllister P., McClure J. y Rafine S. (2005) *Cáncer de Colon y recto, Guías de tratamiento para pacientes. Versión IV, NCCN and American Cancer Society, Inc. EUA.*
- Ahmedin J., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., y Thun M.J. (2006) Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin.* 56: 106-130.
- Ahrer K., Buchacherb A., Ibererb G., Josicb D., y Jungbauer A. (2003) Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering *Journal of Chromatography A.* 1009(1-2), 89-96.
- Aldor I.S., Krawitz D.C., Forrest W., Chen C., Nishihara J.C., Joly J.C., y Champion K.M. (2005) Proteomic Profiling of Recombinant *Escherichia coli* in High-Cell-Density Fermentations for Improved Production of an Antibody Fragment *Biopharmaceutical Applied and Environmental Microbiology.* 71(4): 1717-1728.
- American Cancer Society. *Colorectal cancer Facts & Figures Special Edition 2005.* Atlanta American Cancer Society, 2005 en <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2005CR4PWSecured.pdf>.
- American Cancer Society; 2007. *Cancer Facts & Figures 2007.* Atlanta American Cancer Society, 2007 en <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2007PWSecured.pdf>
- Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., y MacKenzie R. (2005) Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* 24(4): 501-19.
- Arndt K.M., Muller K.M., y Pluckthun A. (1998) Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry.* 37(37): 12918-26.
- Askling J., Dickman P., Karlen P., Brostrom O., Lapidus A., Lofberg R., y Ekbohm A. (2001) Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 120(6): 1356-1362.
- Asvadi P., Fletcher A., y Raison R.L. (2002) Expression and functional analysis of recombinant scFv and Diabody fragments with specificity for human RhD *J. Mol. Recognit.* 15: 321-33.

- Atwell J.L., Breheny K.A., Lawrence L.J., McCoy A.J., Kortt A.A., y Hudson P.J. (1999) scFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: length of the linker between V_H and V_L domains dictates precisely the transition between diabodies and triabodies. *Protein Eng.* 12: 597-604.
- Baranov V., Yeung M.M.W., y Hammarstrom S. (1994) Expression of carcinoembryonic antigen and nonspecific cross-reacting 50 kDa antigen in human normal and cancerous colon mucosa: comparative ultrastructural study with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 54: 3305-3314.
- Barth S., Huhn M., Matthey B., Klimka A., Galinski A., y Engert A. (2000) Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl. Envir. Microbiol.* 66: 1572-1579.
- Batra S.K., Jain M., Wittel U.A., Chauhan S.C., y Colcher D. (2002) Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr Opin Biotechnol.* 13(6): 603-8.
- Behr T, Becker W, Hannappel E, Goldenberg D.M., y Wolf F. (1995) Targeting of liver metastases of colorectal cancer with IgG, F(ab')₂ and Fab' anti-carcinoembryonic antigen antibodies labeled with ^{99m}Tc: The role of metabolism and kinetics (suppl). *Cancer Res.* 55 (23): 5777-5785.
- Behr T.M., Sharkey R.M., Juweid M.I., Dunn R.M., Ying Z., Zhang C.H., Siegel J.A., Gold D.V., y Goldenberg D.M. (1996) Factors influencing the pharmacokinetics, dosimetry, and diagnostic accuracy of radioimmunodetection and radioimmunotherapy of carcinoembryonic antigen-expressing tumors. *Cancer Res.* 56: 1805-1816.
- Behr T.M., Goldenberg D.M., y Becker W. (1998) Reducing the renal uptake of radiolabelled antibody fragments and peptides for diagnosis and therapy: present status, future prospects and limitations. *Eur. J. Nucl. Med.* 25: 201-212.
- Benchimol S., Fuks A., Jothy S., Beauchemin N., Shirota K., y Stanners C.P. (1989) Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 57(2): 327.
- Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Jonson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S., y Whitlow M. (1988) Single-chain antigen-binding protein. *Science.* 242: 423-426.
- Brandts J.F., y Kaplan L.J. (1973) Derivative spectroscopy applied to tyrosyl chromophores. Studies on ribonuclease, lima bean inhibitors, insulin, and pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* 12: 2011-24.
- Boehn M.K., Mayans O.M., Thornton J.D., Begent R.H.J., Keep P.A., y Perkins S.J. (1996) Extended glycoprotein structure of seven domains in human carcinoembryonic antigen by X-ray and neutron scattering and an automated curve fitting procedure: implications for cellular adhesion. *J Mol Biol.* 259: 718-736.

- Boon T., y Old L.J. (1997) Cancer tumor antigens. *Curr Opin Immunol.* 9(5): 681-683.
- Bos J.L. (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49: 4682-4689.
- Boucher D., Cournoyer D., Stanners C.P., y Fuks A. (1989) Studies on the control of gene expression of the carcinoembryonic antigen family in human tissue. *Cancer Res.* 49: 847-52.
- Blanco I., Kawatsu R., Harrison K., Leichner P., Augustine S., Baranowska-Kortylewicz J., Tempero M., y Colcher D. (1997) Antiidiotypic response against murine monoclonal antibodies reactive with tumor-associated antigen TAG-72. *Journal of Clinical Immunology* 17: 96-106.
- Burton D.R., y Barbas C.F. (1994) Human antibodies from combinatorial libraries. *Advances Immunol.* 57: 191-280.
- Cancer Facts and figures. (2007) Special section. Colorectal cancer and early detection. 20-27, Atlanta: American Cancer Society .
- Carter P.J. (2006) Potent antibody therapeutics by design *Nature Reviews Immunology.* 6: 343.
- Clarke K., Lee F., Brechbiel M.W., Smith F.G., Old L.J., y Scott A.M. (2000) In vivo biodistribution of an anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice. *Cancer Research* 60: 4804-4811.
- Colcher D., Zalutsky M., Kaplan W., Kufe D., Austin F., y Schlom J. (1993) Radiolocalization of human mammary tumors in athymic mice by a monoclonal antibody. *Cancer Res.* 43(2): 736-42.
- Colcher D., Pavlinkova G., Beresford G., Booth B.J.M., Choudhury A., y Batra S.K. (1998) Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Q. J. Nucl. Med.* 42: 225-241.
- Colcher D., Goel A., Pavlinkova G., Beresford G., Booth B., y Batra, S.K. (1999) Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. *Q. J. Nucl. Med.* 43: 132-139.
- Colditz G., Atwood K., Emmons R., Monson W., Willet W., Trichopoulos D., y Hunter D. (2000) Harvard report on cancer prevention. Volume 4: Harvard cancer risk index. *Cancer causes & control.* 11: 477-488.
- Colorectal Cancer Facts & Figures, Special edition 2005. Atlanta: American Cancer Society, 2005.
- Das D., Allen T.M., y Suresh M.R. (2005) Comparative evaluation of two purification methods of anti-CD19-c-myc-His₆-Cys scFv. *Protein Expr Purif.* 39(2): 199-208.
- Divgi C.R. (1996) Status of Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Diagnosis and Therapy of Cancer 10(6): 939-958.
- Dolezal O., Pearce L.A., Lawrence L.J., McCoy A.J., Hudson P.J., y Kortt A.A. (2000) ScFv multimers of the anti-neuraminidase antibody NC10: shortening of the linker in single-chain Fv fragment assembled in V_L to V_H orientation drives the formation of dimers, trimers, tetramers and higher molecular mass multimers *Protein Eng.* 13: 565-574.
- Duffy M.J. (2001) Carcinoembryonic Antigen as a Marker for Colorectal Cancer: Is It Clinically Useful?. *Clinical Chemistry* 47: 4624-630.

- Eary J.F., Hrohn K.A., Kishore R., et al: (1988) Radiochemistry of halogenated antibodies, in Zalutsky MR (ed): Antibodies in Radiodiagnosis and Therapy. pp 83-100. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Estadística de salud en Cuba, 2007 en
http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/dne/anuario_estadistico_de_salud_2007_e.pdf
- Fischer R., Drossard J., Emans N., Commandeur U., y Hellwig S. (1999) Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 117-120.
- Fitzgerald K., Holliger P., y Winter G. (1997) Improved tumor targeting by disulphide stabilized diabodies expressed in *Pichia pastoris*. Protein Engineering 10(10): 121-125.
- Frenken L.G.J., Hessing J.G.M., Van den Hondel C.A.M.J.J., y Verrips C.T. (1998) Recent advances in the large scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. Res. Immunol. 149: 589-599.
- Fritsche R., y Mach J.P. (1977) Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen CEA extracted from normal human colon mucosa. Immunochemistry. 14: 119-128.
- Fuchs C., Giovannucci E., Colditz G., Hunter D., Speizer F., y Willet W. (1994) A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 331: 1669-1674.
- Fujimori K., Covell D.O., Fletcher J.E., y Weinstein J.N. (1990) A Modeling Analysis of Monoclonal Antibody Percolation Through Tumors: A Binding-Site Barrier. J. Nucl. Med. 31: 1191-1198.
- Galeffi P., Lombardi A., Di Donato M., Latini A., Sperandei M., Cantale C., y Giacomini P. (2005) Expression of single-chain antibodies in transgenic plants. Vaccine 23: 1823-1827.
- Gavilondo J.V., Ayala M., y Vázquez J. (1993) Manual teórico-práctico, modificación de anticuerpos por ingeniería genética: producción de fragmentos de anticuerpos en bacterias, La Habana, Cuba: 32 pp.
- Goel A., Colcher D., Baranowska-Kortylewicz J., Augustine S., Booth B.J.M., Pavlinkova G., y Batra S.K. (2000) Genetically Engineered Tetravalent Single-Chain Fv of the Pancarcinoma Monoclonal Antibody CC49: Improved Biodistribution and Potential for Therapeutic Application Cancer Res. 60: 6964-6971.
- Goel A., Augustine S., Baranowska-Kortylewicz J., Colcher D., Booth B. J. M., Pavlinkova G., Tempero M., y Batra S.K. (2001) Single-Dose *versus* Fractionated Radioimmunotherapy of Human Colon Carcinoma Xenografts Using ¹³¹I-labeled Multivalent CC49 Single-chain Fvs. Clin. Cancer Res. 7: 175.
- Goel A., Baranowska-Kortylewicz J., Hinrichs S.H., Wisecarver J., Pavlinkova G., Augustine S., Colcher D., Booth B.J.M., y Batra S.K. (2001) ^{99m}Tc-Labeled divalent and tetravalent CC49 single-chain Fv's: Novel imaging agents for rapid in vivo localization of human colon carcinoma. J. Nucl. Med. 42: 1519-1527.

- Gold P., y Freedman S.O. (1965) Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122: 467-481.
- Goldenberg D.M., Sharkey R.M., Paganelli G., Barbet J., y Chatal J-F. (2006) Antibody Pretargeting Advances Cancer Radioimmunodetection and Radioimmunotherapy. *J Clin Oncol.* 24: 823-834.
- Gralow J., Ozols R.F., Bajorin D.F., Cheson B.D., Sandler H.M., Winer E.P., Bonner J., Demetri G.D., Curran W., Ganz P.A., Kramer B.S., Kris M.G., Markman M., Mayer, R.J. Raghavan D., Ramsey S., Reaman G.H., Sawaya R., Schuchter L.M., Sweetenham J.W., Vahdat L.T., Davidson N.E., Schilsky R.L., y Lichter A.S. (2008) Clinical Cancer Advances 2007: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 26: 313-325.
- Hammarström S., Olsen A., Teglund S., y Baranov V. (1997) The nature and expression of the human CEA family, in cell adhesion and communication mediated by the CEA family: Basic and clinical perspectives Stanners C., ed. Harwood Academic Publishers. 1-30.
- Hammarström S. (1999) The Carcinoembryonic antigen (CEA) family: structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Seminars in Cancer Biology.* 9: 67-81.
- Hanes J., Jermutus L., Schaffitzel C., y Plückthun A. (1999) Comparison of Escherichia coli and rabbit reticulocyte ribosome display systems. *FEBS Letters* 450: 105-110.
- Henderikx P., Coolen-van Neer N., Jacobs A., van der Linden, E. Arends, J-W. Ilberg J M., y Hoogenboom H.R. (2002) A Human Immunoglobulin G1 Antibody Originating from an *in Vitro*-Selected Fab Phage Antibody Binds Avidly to Tumor-Associated MUC1 and Is Efficiently Internalized. *American Journal of Pathology.* 160(5): 1597-1608.
- Herbst R.S., Bajorin D.F., Bleiberg H., Blum D., Hao D., Johnson B.E., Ozols R.F., Demetri G.D., Ganz P.A., Kris M.G., Levin B., Markman M., Raghavan D., Reaman G.H., Sawaya R., Schuchter L.M., Sweetenham J.W., Vahdat L.T., Vokes E.E., Winn R.J., y Mayer R.J. (2006) Clinical Cancer Advances 2005: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology. *J. Clin. Oncol.* 24: 190-205.
- Hill M.J., Morson B.C., y Bussey H.J. (1978) Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet* 1: 245-7.
- Hinoda Y., Imai K., Nakagawa N., Ibayashi Y., Nakano T., Paxton R.J., Shively J.E., y Yachi A. (1990) Transcription of biliary glycoprotein I in malignant and non-malignant human liver tissues. *Int. J. Cancer.* 45: 875-878.
- Hochuli E., Dobeli H., y Schacher A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. *J Chromatogr* 411: 177-184.

- Hodoniczky J., Zheng Y.Z., y James D.C. (2005) Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling *in vitro*. *Biotechnology Prog.* 21: 1644-1652.
- Hoffmann A., y Roeder R.G. (1991) Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. *Nucleic Acids Research*, 19(22): 6337-6338.
- Holliger P., Prospero T., y Winter G. (1993) "Diabodies": Small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448.
- Holliger P., Wing M., Pound J.D., Bohlen H., y Winter G. (1997) Retargeting serum immunoglobulin with bispecific diabodies. *Nat. Biotechnol.* 15: 632-636.
- Holliger P., y Bohlen H. (1999) Engineering antibodies for the clinic. *Cancer Metastasis Rev.* 18(4): 411-9.
- Holliger P., y Hudson P. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* 23(9): 1126-1136.
- Horn U., Strittmatter W., Krebber A., Knupfer U., Kujau M., Wenderoth R., Muller K., Matzku S., Pluckthun A., y Riesenberg D. (1996) High volumetric yields of functional dimeric miniantibodies in *Escherichia coli*, using an optimized expression vector and high-cell-density fermentation under non-limited growth conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46(5-6): 524-32.
- Hörig H., Medina F.A., Conkright W.A., y Kaufman H.L. (2000) Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 24 pp.
- Hu S., Shively L., Raubitschek A., Sherman M., Williams L. E., Wong J.Y.C., Shively J.E., y Wu A.M. (1996) Minibody: A novel engineered anti-carcinoembryonic antigen antibody fragment (single-chain F_V-C_H3) which exhibits rapid, high-level targeting of xenografts. *Cancer Research* 56: 3055-3061.
- Huang B., Foote L.J., Lankford T.K., Darvern S.M., McKeown C.K., y Kennel S.J. (2005) A diabody that dissociates to monomer forms at low concentration: effects on binding activity and tumor targeting. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327: 999-1005.
- Hudson P.J. (1999) Recombinant antibody constructs in cancer therapy. *Curr Opin Immunol.* 11(5): 548-57.
- Hudson P.J. (2000) Recombinant antibodies: a novel approach to cancer diagnosis and therapy. *Exp. Opin. Invest. Drugs.* 9(6):1231-42.
- Hudson P.J., y Souriau C. (2003) Engineered antibodies. *Nature Medicine.* 9(1): 129-134.
- Huston J.S., Levinson D., Mudgett-Hunter M., Tai M.-S., Novotn J., Margolies M.N., Ridge R.J., Bruccoleri R.E., Haber E., Crea R., y Oppermann H. (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain F_V analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883.
- <http://www.uic.com.au/nip26.htm>

- <http://bvs.sld.cu/cgi-bm>
- <http://www.clinicaltrials.gov>
- Jain R.K. (1990) Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev.* 9(3): 253-66.
- Jain R.K. (1990) Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res*; 50 (Suppl 3): 814s-819s.
- Jain M., y Batra S.K. (2003) Genetically Engineered Antibody Fragments and PET Imaging: A New Era of Radioimmunodiagnosis. *J. Nucl. Med.* 44: 1970-1972.
- Joosten V., Lokman C., Van den Hondel C.A.M.J., y Punt P.J. (2003) The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeast and filamentous fungi. *Microbial cell factories* 2 (1): páginas no disponibles.
- Jothy S., Yuan S.Y., y Shirota K. (1993) Transcription of carcinoembryonic antigen in normal colon and colon carcinoma. *Am. J. Pathol.* 143: 250-257.
- Kabat E.A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman R., y Foellner C. (1991) Fifth Edition. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Institutes of Health. NIH Publication
- Kang N., Hamilton S., Odili J., Wilson G., y Kupsch J. (2000) In vivo targeting of malignant melanoma by ¹²⁵I- and ^{99m}Tc-labeled single-chain Fv fragments against high molecular weight melanoma-associated antigen. *Clin. Cancer Res.* 6: 4921.
- Kenanova V., Olafsen T., Crow D.M., Sundaresan G., Subbarayan M., Carter N.H., Ikle D.N., Yazaki P.J., Chatziioannou A.F., Gambhir S.S., Williams L.E., Shively J.E., Colcher D., Raubitschek A.A., y Wu A.M. (2005) Tailoring the Pharmacokinetics and Positron Emission Tomography Imaging Properties of Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments. *Cancer Res.* 65: 622-631.
- Kenanova V., Olafsen T., Williams L.E., Ruel N.H., Longmate J., Yazaki P.J., Shively J.E., Colcher D., Raubitschek A.A., y Wu A.M. (2007) Radioiodinated versus Radiometal-Labeled Anti-Carcinoembryonic Antigen Single-Chain Fv-Fc Antibody Fragments: Optimal Pharmacokinetics for Therapy. *Cancer Res.* 67(2): 718-726.
- Khan W.N., Teglund S., Bremer K., y col. (1992) The pregnancy-specific glycoprotein family of the immunoglobulin superfamily: identification of new member and estimation of family size. *Genomics.* 12 (4): 780.
- Kholer G., y Milstein C. (1975) Continuous culture of fused cell secreting antibodies of predefined specificity. *Nature.* 256: 495-497.
- Kiaris H., y Spandidos D.A. (1995) Mutations of ras genes in human tumors. *Int J Oncol.* 7: 413-421.

- Kim J., Kaye F.J., Henslee J.G., Shively J.E., Park J.G., Lai S.L., Linnoila R.I., Mulshine J.L., y Gazdar A.F. (1992) Expression of carcinoembryonic antigen and related genes in lung and gastrointestinal cancers. *Int. J. Cancer*. 52: 718-725.
- Kinugasa T., Kuroki M., Yamanaka T., Matsuo Y., Oikawa S., Nakazato H., y Matsuoka Y. (1994) Non-proteolytic release of carcinoembryonic antigen from normal human colonic epithelial cells cultured in collagen gel. *Int. J. Cancer*. 58: 102-107.
- Kleist S.V., Chavanel G., y Burtin P. (1972) Identification of an Antigen from Normal Human Tissue that Crossreacts with the Carcinoembryonic Antigen. *PNAS*. 69: 2492-2494.
- Kolodziej P.A., y Young R.A. (1991) Epitope tagging and protein surveillance. *Methods Enzymol*, 194: 508-19.
- Kortt A.A., Lah M., Oddie G.W., Gruen L.C., Burns J.E., Pearce L.A., Atwell J.L., McCoy A.J., Howlett G.J., Metzger D.W., Webster R.G., y Hudson P.J. (1997) Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residues linker form dimers and with zero-residues linker a trimer. *Protein Eng*. 10(4): 423-433.
- Kortt A.A., Dolezal O., Power B.E., y Hudson P.J. (2001) Dimeric and trimeric antibodies: high avidity scFvs for cancer targeting. *Biomol Eng*. 18(3): 95-108.
- Le Boeuf R.D., Galin F.S., Hollinger S.K., Peiper S.C., y Blalock J.E. (1989) Cloning and sequencing of immunoglobulin variable region genes using degenerate oligodeoxiribonucleotides and polymerase chain reaction. *Gene*. 82: 371-377.
- Le Gall F., Kipriyanov S.M., Moldenhauer G., y Little M. (1999) Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding. *FEBS Lett*. 453(1-2): 164-8.
- Le Gall F., Reusch U., Little M., y Kipriyanov S.M. (2004) Effect of linker sequences between the antibody variable domains on the formation, stability and biological activity of a bispecific tandem diabody. *Protein Eng. Des. Sel*. 17: 357-366.
- Lesser G.J., y Rose G.D. (1990) Hydrophobicity of amino acid subgroups in proteins. *Proteins*. 8(1): 6-13.
- Lichty J.J., Malecki J.L., Agnew H.D., Michelson-Horowitz, D.J., y Tan S. (2005) Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif*. 41(1): 98-105.
- Lindmo T., Boven E., Cuttitta F., Fedorko J., y Bunn P.A. Jr. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods*. 72(1): 77-89.
- Liu S., y Edwards D.S. (2001) Stabilization of (90) y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconj Chem*. 12(4): 554-8.
- Lonberg N. (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology* 23(9): 1117-1125.

- Mach J-P., y Puztaszeri G. (1972) Carcinoembryonic antigen CEA: demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochemistry* 9: 1031-1034.
- Mann B.D., Cohen M.B., Saxton R.E., Morton D.L., Benedict W.F., Korn E.L., Spolter L., Graham L.S., Chan C.C., y Burk M.W. (1984) Imaging of human tumor xenografts in nude mice with radiolabeled monoclonal antibodies. Limitations of specificity due to nonspecific uptake of antibody. *Cancer (Phila.)*. 54: 1318-1327.
- Mateo C., Lombardero J., Moreno E., Morales A., Bombino G., Coloma J., Wims L., Morrison S.L., y Pérez R. (2000) Renoval of amphipatic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma* 19: 463-471.
- Mattes M.J., Griffiths G.L., Diril H., Goldenberg D.M., Ong G.L., y Shil L.B. (1994) Processing of antibody-radiosotope conjugates after binding to the surface of tumor cells. *Cancer (Phila.)*. 73:787-793.
- Maurer R., Meyer B., y Ptashne M. (1980) Gene regulation at the right operator (OR) bacteriophage lambda. I. OR3 and autogenous negative control by repressor. *J Mol Biol.* 139: 147-161.
- McCarron P.M., Olwill S.A., Marouf W.M.Y., Buick R.J., Walker B., y Scott C.J. (2005) Antibody Conjugates and Therapeutic Strategies. *Molecular Interventions*. 5(6): 368-379.
- McConahey P.J., y Dixon F.J. (1966) A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int Arch Allergy Immunol.* 29:185-189.
- McEntire J. Selection and Validation of Analytical Techniques. (1994) *Biopharm* 7, 68-80.
- Miller K.D., Weaver-Feldhaus J., Gray S.A, Siegel R.W., y Feldhaus M.J. (2005) Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 42 (2): 255-67.
- Milstein C. (1999) The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays*. 21(11): 966-73.
- Moore J.T., Uppal A., Maley F., y Maley G.F. (1993) Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr Purif.* 4(2): 160-3.
- Nap M., Mollgard K., Burtin P., y Fleuren G.J. (1988) Immunohistochemistry of carcinoembryonic antigen in the embryo, fetus and adult. *Tumor Biol.* 9: 145-153.
- Nap M., Hammarstrom M.L., Borner O., Hammarstrom S., Wagener C., Handt S., Schreyer M., Mach J.P., Buchegger F., von Kleist S., Grunert F., Seguin P., Fuks A., Holm R., y Lamerz R. (1992) Specificity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. *Cancer Res.* 52: 2329-2339.

- Narula J., Petrov A., Ditlow C., Pak K.Y., Chen F.W., y Khaw B.A. (1997) Maximizing radiotracer delivery to experimental atherosclerotic lesions with high-dose, negative charge-modified Z2D3 antibody for immunoscintigraphic targeting. *J. Nucl. Cardiol.* 4:226-233.
- Nieba L., Nieba-Axmann S.E., Persson A., Hämäläinen M., Edebratt F., Hansson A., Lidholm J., Magnusson K., Karlsson A.F., y Plückthun A. (1997) BIACORE Analysis of Histidine-Tagged Proteins using a Chelating NTA Sensor Chip. *Analytical Biochemistry* 252: 217-228.
- Nikula T.K., Bocchia M., Curcio M.J., Sgouros G., Ma Y., Finn R.D., y Scheinberg D.A. (1995) Impact of the high tyrosine fraction in complementarity determining regions: measured and predicted effects of radioiodination on IgG immunoreactivity. *Mol. Immunol.* 32(12): 865-72.
- Nils L. (2005) Human antibodies from transgenic animals. *Nature Biotechnology.* 23: 1117.
- Obrink B. (1997) CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 171-177.
- Oikawa S., Kuroki M., Matsuoka Y., Kosaki G., y Nakazato H. (1992) Homotypic and heterotypic Ca²⁺-independent cell adhesion activities of biliary glycoprotein, a member of carcinoembryonic antigen family, expressed on CHO cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186: 881-887.
- Olafsen T., Bruland O.S., Zalutsky M.R., y Sandlie I. (1996) Abundant tyrosine residues in the antigen binding site in anti-osteosarcoma monoclonal antibodies TP-1 and TP-3: Application to radiolabeling. *Acta Oncol.* 35(3): 297-301.
- Olafsen T., Tan G.J., Cheung C., Yazaki P.J., Park J.M., Shively J.E., Williams L.E., Raubitschek A.A., Press M.F., y Wu A.M. (2004) Characterization of engineered anti-p185^{HER-2} (scFv-C_H3)₂ antibody fragments (minibodies) for tumor targeting. *Protein Eng. Des. Sel.* 17: 315-323.
- Olafsen T., Cheung C., Yazaki P.J., Li L., Sundaresan G., Gambhir S.S., Sherman M.A., Williams L.E., Shively J.E., Raubitschek A.A., y Wu A.M. (2004) Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng. Des. Sel.* 17: 21-27.
- Oliva J.P., Pimentel G., Velasco M., Martinez A., Ortiz R., Abreu M., Diaz N., Oliver B., Sanchez I., Valladares T., Baum R.P. (2005) Radio-immunodetection of Colorectal Cancer using Tc-99m labeled Monoclonal Antibody ior-CEA1: Results of a Phase III Clinical Trial. *World J Nucl Med.* 4: 150-158.
- Olsen A., Teglund S., Nelson D., Gordon L., Copeland A., Georgescu A., Carrano A., y Hammarstrom S. (1994) Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: Assembly and analysis of a 700 kb cosmid contig spanning the region. *Genomics.* 23: 659-668.
- Oriuchi N., Higuchi T., Hanaoka H., Ida Y., y Endo K. (2005) Current status of cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibody. *Annals of Nuclear Medicine.* 19(5): 355-365.

- Oyen W.J.G., Bodei L., Giammarile F., Maecke H.R., Tennvall J., Luster M., y Brans B. (2007) Targeted therapy in nuclear medicine-current status and future prospects. *Annals of Oncology*. 18: 1782-1792.
- Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., y Gray T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4: 2411-2423.
- Pack P., y Plückthun A. (1992) Miniantibodies: Use of Amphipathic Helices to Produce Functional, Flexibly Linked Dimeric Fv Fragments with High Avidity in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 31:1579-1584.
- Pato G.C., Calvo O.F., Campelo M.R.G., y Alfonsín F.L. (2006) Cáncer de colon. *Guías Clínicas* 6(37): 1-4.
- Pavoni E., Flego M., Dupuis M.L., Barca S., Petronzelli F., Anastasi A.M., D'Alessio V., Pelliccia A., Vaccaro P., Monteriù G., Ascione A., De Santis R., Felici F., Cianfriglia M., y Minenkova O. (2006) Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer*, 6:41.
- Pavlinkova G., Beresford G.W., Booth B.J.M., Batra S.K., y Colcher D. (1999) Pharmacokinetics and biodistribution of engineered single-chain antibody constructs of MAb CC49 in colon carcinoma xenografts. *J. Nucl. Med.* 40: 1536-1546.
- Pavlinkova G., Booth B.J.M., Batra S.K., y Colcher D. (1999) Radioimmunotherapy of human colon cancer xenografts using a dimeric single-chain Fv antibody construct. *Clinical Cancer Research*. 5: 2613-2619.
- Peto J. (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411: 390-95.
- Pieramici D.J., y Avery R.L. (2006) Ranibizumab: Treatment in patients with neovascular age-related macular degeneration. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6: 1237-1245.
- Pimentel G.J., Vazquez J.E., Quesada W., Felipe Y., Carderon C., Freyre F.M., Oliva J.P., y Gavilondo J.V. (2001) *Nucl Med Commun.* 22: 1089-1094.
- Pimentel G.J., Oliva J.P., Peralta R., Gonzáles A., y Sanchez J. (2004) Pharmacokinetics of the Anti-CEA Monoclonal Antibody: Tc-99m iorCEA.1. *World J Nucl Med.* 3: 119-124.
- Plückthun A. (1991) Strategies for the expression of antibody fragments in *Escherichia coli*. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2(2): 88-96.
- Plückthun A. (1991) Antibody Engineering: Advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Biotechnology* 9: 545-551.
- Plückthun A., Krebber A., Krebber C., Horn U., Knüpfer U., Wenderoth R., Nieba L., Proba K., y Riesenberg D. (1996) Producing antibodies in *Escherichia coli*: From PCR to fermentation. En McCafferty J., Hoogenboom H., Chiswell D. (eds) *Antibody Engineering. A practical approach*, Oxford University Press, Oxford, pp 203-252.
- Ponder B.A.J. (2001) Cancer Genetics. *Nature* 411: 336-341.
- Raag R., y Whitlow M. (1995) Single-chain Fvs. *FASEB J.* 9: 73.

- Reichert J.M., Rosensweig C.J., Faden L.B., y Dewitz M.C. (2005) Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnology* 23(9): 1073-1078.
- Ren X., Gao S., You D., Huang H., Liu Z., Mu Y., Liu J., Zhang Y., Yan G., Luo G., Yang T., y Shen J. (2001) Cloning and expression of a single-chain catalytic antibody that acts as a glutathione peroxidase mimic with high catalytic efficiency. *Biochem J.* 359(Pt 2): 369-74.
- Ries L., Eisner M., Kosary C., Hankey B., Mille B., Clegg L., y Edwards B. (2001) SEER Cancer statistics review, 1973-1998. Bethesda, MD. National Cancer Institute.
- Rietchmann L., Clark M., Waldmann H., y Winter G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332: 323-327.
- Richter A., Jostameling M., Müller K., Herrmann A., y Pitschke M. (2004) Quality control of antibodies for human use. En: Subramanian G. editor. *Antibodies, Volume 1, Production and Purification*. New York; Kluwer Academic: 169-188.
- Robbins P., Eggensperger D., Qi C.F., y Schlom J. (1993) Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas. *Int. J. Cancer.* 53: 892-897.
- Rode H.J., Little M., Fuchs P., Dorsam H., Schooltink H., Ines de C., Duvel S., y Breiling F. (1996) Cell surface display of a single-chain antibody for attaching polypeptides. *BioTechniques.* 21: 652-659.
- Saga T., Neumann R.D., Heya T., Sato J., Kinuya S., Le N., Paik C.H., y Weinstein J.N. (1995) Targeting Cancer Micrometastases with Monoclonal Antibodies: A Binding-Site Barrier. *PNAS.* 92: 8999-9003.
- Sambrook J., Fritsch E.F., y Maniatis T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Sancho J., González E., Rivera F., Escanero J.F., y Egido J. (1984) Hepatic and kidney uptake of soluble monomeric and polymeric IgA aggregates. *Inmunology*, 52: 161-167.
- Sanchez A., Ramos Y., Solano Y., Gonzalez L.J., Besada V., Betancourt L., Gil J., Alvarez F., Rodriguez M., Perez L., Pujol M., y Padron G. (2007) Double acylation for identification of amino-terminal peptides of proteins isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21: 2237-2244.
- Schmidt M., Hynes N.E., Groner B., y Wels W. (1996) A bivalent single-chain antibody-toxin specific for ErbB-2 and the EGF receptor *Int J Cancer.* 65(4): 538-46.
- Sharkey R.M., Karacay H., Cardillo T.M., Chang C.-H., J.McBride W., Rossi E.A., Horak I.D., y Goldenberg D.M. (2005) Improving the Delivery of Radionuclides for Imaging and Therapy of Cancer Using Pretargeting Methods. *Clin Cancer Res* 11(19 Suppl): 7109s-7121s.
- Sharkey R.M., y Goldenberg D.M. (2006) Targeted Therapy of Cancer: New Prospects for Antibodies and Immunoconjugates. *CA Cancer J Clin.* 56: 226-243.

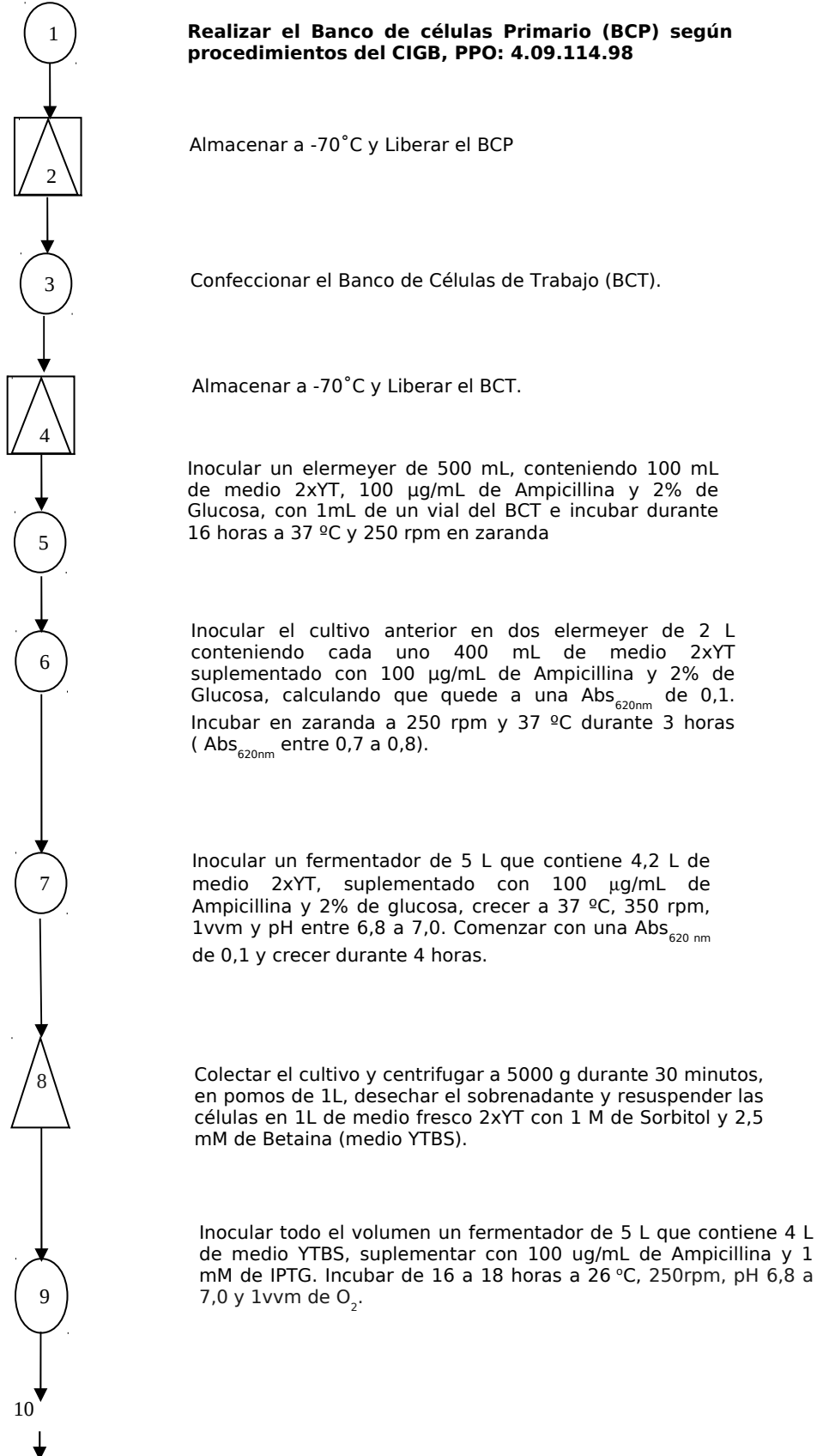
- Shi Z.R., Tacha D., y Itzokowitz H. (1994) Monoclonal antibody COL-1 reacts with restricted epitopes on carcinoembryonic antigen: an immunohistochemical study. *J Histochem Cytochem* 42: 1215-1219.
- Silva J.A., Peñalver J.M., Galan Y., Lescano M., y Gruerio S. (2001) Incidencia del cáncer de piel en Cuba 1988-1997. *Revista Cubana de ontología*. 17(3): 151-157.
- Sippel C.J., Shen T., y Perlmutter D.H. (1996) Site-directed mutagenesis within an ectoplasmic ATPase consensus sequence abrogates the cell aggregating properties of the liver canicular bile acid transporterrecto-ATPase cell CAM 105 and carcinoembryonic antigen. *J. Biol. Chem.* 271: 33095-33104.
- Skerra A., y Plückthum A. (1988) Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* 263: 14315-14322.
- Soares C.R.J., Gomide F.I.C., Ueda E.K.M., y Bartolini P. (2003) Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the PL promoter: use of HPLC for product quantification. *Protein Engineering* 16(12): 1131-1138.
- Stein R., Govindan S.V., Hayes M., Griffiths G.L., Hansen H.J., Horak I.D., y Goldenberg D.M. (2005) Advantage of a Residualizing Iodine in the Therapy of a Colon Cancer Xenograft Targeted with an Anticarcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody. *Clin. Cancer Res.* 11(7): 2727-2734.
- Svenberg T. (1976) Carcinoembryonic antigen-like substances of human bile. Isolation and partial characterization. *Int. J. Cancer* 17: 588-596.
- Svenberg T., Hammarstrom S., y Hedin A. (1979). Purification and properties of biliary glycoprotein (BGP)-immunochemical relationship to carcinoembryonic antigen. *Mol. Immunol.* 16: 245-252.
- Tachovsky G.T. (1990). Molecular engineering of recognition systems. *Antibody Engineering. New Technology & Application Implications*. Páginas no disponibles.
- Tahtis K., Lee F., Smyth F.E., Power B.E., Renner C., Brechbiel M.W., Old L.J., Hudson P.J., y Scott A.M. (2001). Biodistribution properties of ¹¹¹Indium-labeled C-functionalized *trans*-cyclohexyl diethylenetriaminepentaacetic acid humanized 3S193 diabody and F(ab')₂ constructs in a breast carcinoma xenograft model. *Clinical Cancer Research.* 7: 1061-1072.
- Tanaka K., Hinoda Y., Takahashi H., Sakamoto H., Nakajima Y., y Imai K. (1997). Decreased expression of biliary glycoprotein in hepatocellular carcinomas. *Int. J. Cancer.* 74: 15-19.
- Taylor D.D., y Black P.H. (1985). Inhibition of macrophage Ia antigens expression by shed plasma membrane vesicles from metastatic murine melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 74: 859-866.
- Thakur M.L., y DeFulvio J.D. (1991). Technetium-99m-labeled monoclonal antibodies for immunoscintigraphy. Simplified preparation and evaluation. *J Immunol Methods.* 137(2): 217-24.

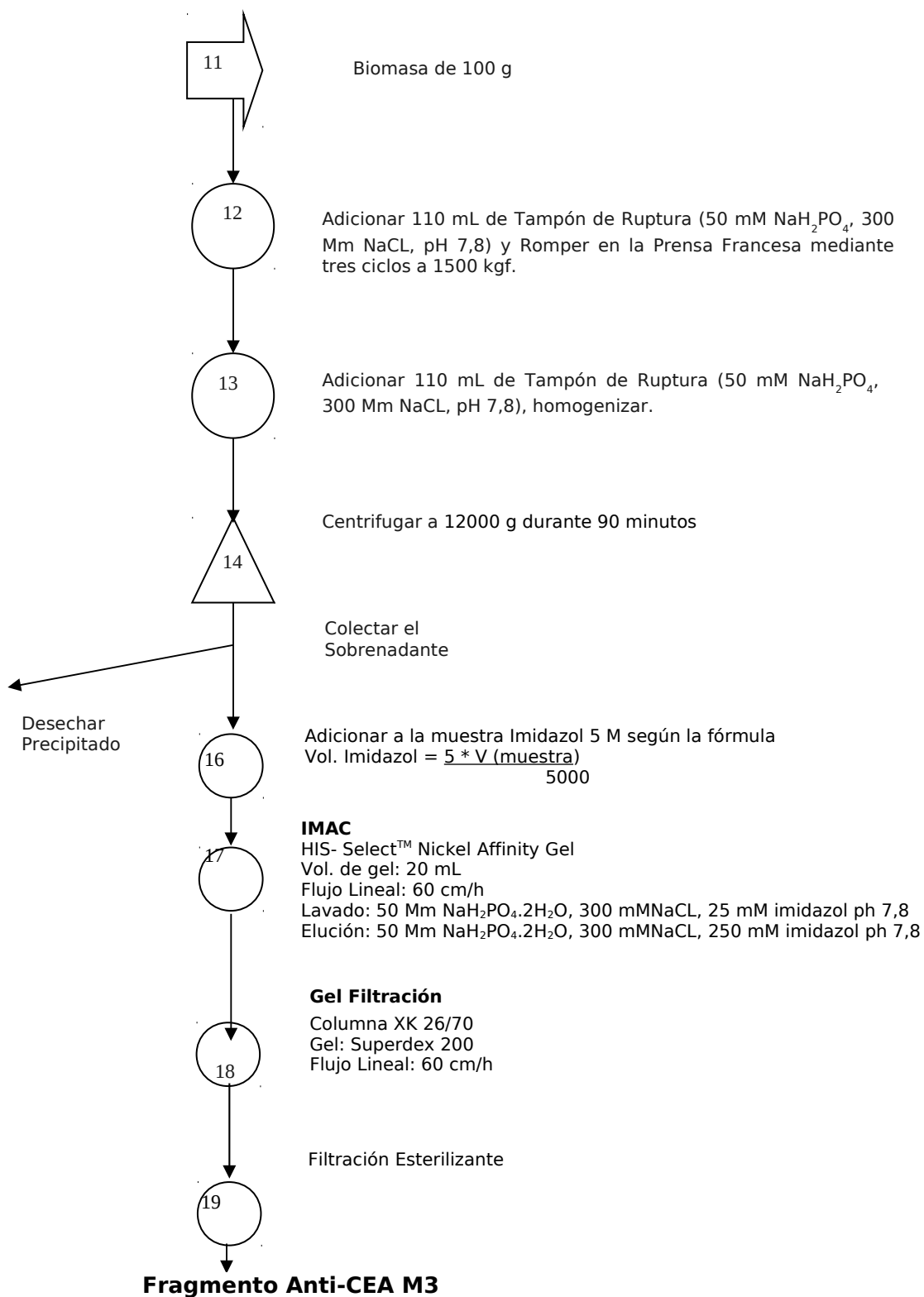
- Thomson D.M.P., Krupey J., Freedman S.O., y Gold P. (1969). The radioimmunoassay of circulating carcinoembryonic antigen of the human digestive system. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 161-7.
- Thompson J., Zimmermann W., Nollau P., Neumaier M., We-ber-Arden J., Schrewe H., Craig I., y Willcocks T. (1994). CGM2, a member of the carcinoembryonic antigen gene family is down-regulated in colorectal carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269: 32924-32931.
- Todorovska A., Roovers R.C., Dolezal O., Kortt A.A., Hoogenboom H.R., y Hudson P.J. (2001). Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J Immunol Methods.* 248(1-2): 47-66.
- Tomlinson I., y Holliger P. (2000). Methods for generating multivalent and bispecific antibody fragments. *Methods Enzymol.* 326: 461-479.
- Torres Vidal R.M., y Gran Alvares M.A. (2005) Impacto del cáncer de colon en la morbilidad y la mortalidad de la población cubana. 1979-2003. *Rev. Temas Estadísticos de Salud.* 1.
- Tormo B.R., Gavilondo J.V., Dominguez C., Freyre M., Rodriguez T., y Biberfeld P. (1989) CEA in colonic adenocarcinomas and precancerous lesions. An immunohistochemical study with a novel monoclonal antibody. *APMIS* 97: 1073-80.
- Towbing H., Staehelin T., y Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from poliacrilamida gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 76: 4350.
- Uehara M., Manaka D., Baba S., Oji Y., Hirata K., Shimizu M., y Noguchi M. (2007) Prognostic study of preoperative serum levels of CEA and CA 19-9 in colorectal cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 34(9): 1413-1417.
- Von Kleist S., Chavanel G., y Burtin P. (1972). Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2492-2494.
- Waibel R., Alberto R., Willuda J., Finnern R., Schibli R., Stichelberger A., Egli A., Abram U., Mach J.-P., Plückthun A., y Schubiger P.A. (1999) Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc(I)-carbonyl complex. *Nature Biotechnology* 17: 897-901.
- Watanabe S., y Chou J.Y. (1988). Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human pregnancy-specific b1 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 263: 2049-2054.
- Weber B.L. (2002) Cancer Genomics. *Cancer cell.* 1: 37-47.
- Whitaker J.R. y Granum P.E. (1980) An absolute method for pretein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Analytical Biochemistry.* 109(1): 156-159.
- Whitlow M., Bell B.A., Feng S.-L., Filpula D., Hardman K.D., Hubert S.L., Rollence M., Wood J.F., Schott M.E., Milenic D.E., Yokota T., y Schlom J. (1993) An improved linker for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability. *Protein Eng.* 6: 989-995.

- Willuda J., Kubetzko S., Waibel R., Schubiger A., Zangemeister-Wittke U. and Plückthun A. (2001). Tumor targeting of mono-, di-, and tetravalent anti-p185^{HER-2} miniantibodies multimerized by self-associating peptides. *The journal of Biological Chemistry*. 276. 17: 14385-14392.
- Wong J.Y., Chu D.Z., Williams L.E, Yamauchi D.M., Ikle D.N., Kwok C.S., Liu A., Wilczynski S., Colcher D., Yazaki, P.J., Shively J.E., Wu A.M., y Raubitschek A.A. (2004) Pilot Trial Evaluating an ¹²³I-Labeled 80-Kilodalton Engineered Anticarcinoembryonic Antigen Antibody Fragment (cT84.66 Minibody) in Patients with Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res*. 10: 5014-5021.
- Wright A., Shin S-U., y Morrison S.L. (1992) Genetically engineered antibodies: progress and prospects. *Crit. Rev. Immunol*. 12: 125-168.
- Wu A.M., Chen W., Raubitschek A., Williams L.E., Neumaier M., Fischer R., Hu S.Z., Odom-Maryon T., Wong J.Y., y Shively J.E. (1996) Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimmers. *Immunotechnology*. 2(1): 21-36.
- Wu A.M., Williams L.E., Zieran L., Padma A., Sherman H., Bebb G.G., Odom-Mayron T., Wong J.Y.C., Shively J.E., y Raubitschek A.A. (1999). Anticarcinoembryonic antigen (CEA) diabody for rapid tumor targeting and imaging. *Tumor Targeting*. 4: 47-54.
- Wu A.M., y Senter P.D. (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nature Biotechnology* 23: 1137-1146.
- Wyatt P.J. (1993) Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Anal. Chim. Acta*. 272, 1-40.
- Yamashita K., Totani K., Kuroki M., Matsuoka Y., Ueda I., y Kobata A. (1987). Structural studies of the carbohydrate moieties of carcinoembryonic antigens. *Cancer Res*. 47: 3451-3458.
- Yamashita K., Totani K., Iwaki Y., Kuroki M., Matsuoka Y., Endo T., y Kobata A. (1989). Carbohydrate structures of nonspecific cross-reacting antigen 2 a glycoprotein purified from meconium as an antigen cross-reacting with anticarcinoembryonic antigen antibody. *J. Biol. Chem*. 264: 17873-17880.
- Yazaki P.J., Shively L., Clark C., Cheung C-W., Le W., Szpikowska B., Shively J. E., Raubitschek A. A., y Wu A. M. (2001). Mammalian expresión and hollow fiber birreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications. *J. Immunol. Methods*. 253: 195-208.
- Yokota T., Milenic D.E., Whitlow M., Wood J.F., Hubert S.L., y Schlom J. (1993). Microautoradiographic analysis of the normal organ distribution of radioiodinated single-chain Fv and other immunoglobulin forms (Published erratum in *Cancer Res.*, 53: 5832, 1993). *Cancer Res.*, 53: 3776-3783.
- Zimmermann W., Weber B., Ortlieb B., Rudert F., Schempp W., Fiebig H.H., Shively J.E., von Kleist S., y Thompson J. (1988). Chromosomal localization of the carcinoembryonic antigen gene family and differential expression in various tumors. *Cancer Res*. 48: 2550-2554.

Zimmermann R. (2007) Nuclear Medicine, Radioactivity for Diagnosis and Therapy. EDP Sciences, Paris, Francia.

Anexo 2



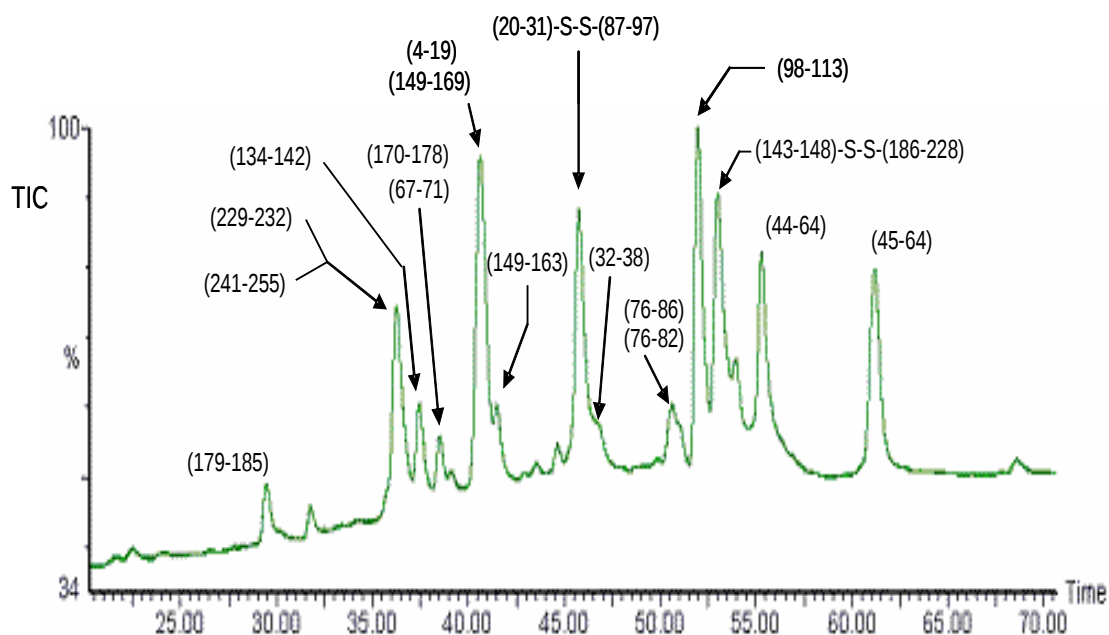


Anexo 3

Resumen de los péptidos secuenciados luego del tratamiento con diferentes enzimas. Los péptidos que contienen puentes disulfuros se muestran de la siguiente manera ()s-s().

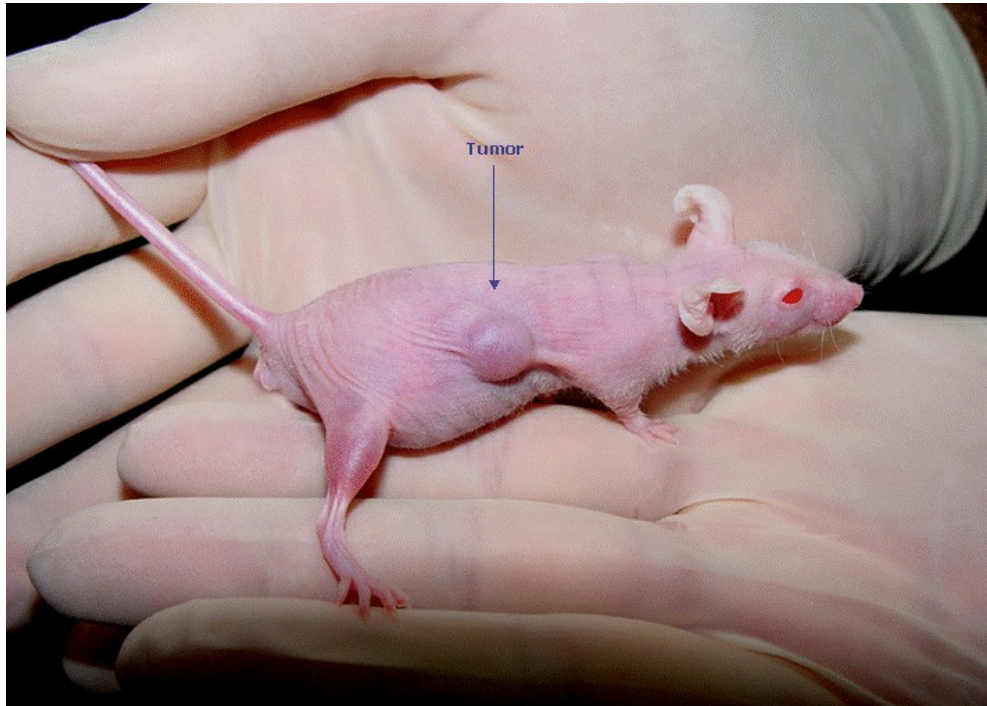
Posición	m/z exp	z	Enzima (procedimiento)
1-31	1145.89	3	Tripsina (doble acetilación)
(20-31)s-s(93-97)	498.3	3	Tripsina (sin R-PAM)
32-38	954.42	1	Tripsina (doble acetilación)
20-43	713.59	4	LEP
45-66	844.40	3	Tripsina (doble acetilación)
67-71	665.35	1	Tripsina (doble acetilación)
76-86	690.36	2	Tripsina (doble acetilación)
87-97	731.32	2	Tripsina (doble acetilación)
98-133	1291.58	3	Tripsina (R-PAM)
134-142	500.26	2	Tripsina (sin R-PAM)
(143-148)s-s(186-228)	1311.63	3	Tripsina (sin R-PAM)
149-169	754.07	3	Tripsina (sin R-PAM)
170-178	498.3	2	Tripsina (sin R-PAM)
235-255	611.29	4	Asp-N
241-255	614.64	3	Tripsina (sin R-PAM), LEP

Espectro ESI-MS obtenido durante el análisis por LC-MS de digestiones trypticas del fragmento, se indican los fragmentos de péptidos detectados en cada fracción.



Anexo 4

Ratón atímico xenotransplantado con células humanas LS 174T mostrando el tumor generado 10 días después de inocular.



Anexo 5**CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN EN LA INVESTIGACIÓN**

El que suscribe _____

Nombre del paciente

diagnosticado de adenocarcinoma colorectal expone que con el objetivo de decidir mi participación en el ensayo clínico denominado “Evaluación de un fragmento multivalente de anticuerpo anti-CEA radiomarcado en pacientes con adenocarcinoma colorectal” y obtener mi consentimiento, he recibido una amplia explicación por parte de mi médico

Dr(a): _____ quien me ha ofrecido la siguiente información:

I. INFORMACIÓN**1. Datos sobre el Fragmento de Anticuerpo anti-CEA M3**

Se trata del fragmento recombinante de anticuerpo anti-CEA M3, que es una biomolécula que reconoce al antígeno carcinoembrionario (CEA) presente en neoplasias de colon y recto, razón por la cual se estudiarán sus posibilidades potenciales para su uso en el diagnóstico temprano y tratamiento de este tipo de patología. Este producto será marcado con un isótopo radioactivo, en este caso el ^{131}I , para realizar estudios imagenológicos con Cámara Gamma. Este producto se fabrica en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) de La Habana, Cuba.

2. Consideraciones previas

La Inmunogammagrafía (InGG) es un procedimiento de diagnóstico no invasivo que permite estudiar mediante imágenes la distribución en el cuerpo de un radiofármaco administrado a un paciente. Los pacientes que participen en este ensayo serán rigurosamente seleccionados basándose en el estado clínico de la enfermedad, sin tratamientos oncoespecíficos previos, con valores normales de laboratorio clínico y sin antecedentes de enfermedades crónicas descompensadas u otro tipo de neoplasia interferente. En este estudio participarán 20 pacientes.

3. Objetivo general

1. Determinar la seguridad biológica, biodistribución, dosimetría interna y farmacocinética del fragmento recombinante de anticuerpo anti-CEA M3 marcado con ^{131}I administrado por vía intravenosa en dosis única de 0.3 ó 1 mg, en pacientes con cáncer colorectal.

4. Tratamiento e investigaciones

Se me explicó que permaneceré ingresado durante el estudio por un período de 72 horas en la sala Q del Instituto de Oncología. Recibiré una dosis de 0.3 mg ó 1 mg de fragmento M3 marcado con 5-7 mCi de ^{131}I , en dependencia de grupo de estudio en el cual sea incluido. El producto se administrará por vía intravenosa en un lapso de tiempo de 1-2 minutos. Durante la administración y las 2h posteriores a la misma, estará junto a mi un médico y enfermera especializados para atender cualquier efecto secundario que presente. Posterior a las 72 horas de ingreso podré recibir el tratamiento específico para mi enfermedad de manera ambulatoria.

Para evitar en este estudio la acumulación de ^{131}I en la glándula tiroides se administrará Solución Lugol. Comenzaré a tomar 10 gotas diarias de Lugol junto con jugos caseros a las 10 AM, un mínimo de 3 días antes de la realización de la InGG. Luego continuaré tomando el Lugol a razón de 5 gotas diarias con jugos caseros a las 10 AM por una semana más (7 días) luego de realizada la InGG.

Se me ha informado que para evitar la eliminación del producto marcado por las heces fecales se me realizará un enema evacuante a las 10:00 pm la noche anterior a la fecha de comienzo de los estudios gammagráficos y otro a las 6:00 am el día de comienzo de estos estudios.

Se me explicará la conducta a seguir durante la InGG. Se me harán mediciones de actividad en cuerpo completo con cámara gamma antes de los 60 min y a las 2h, 4h, 8h, 24h, 48h y 72h después de la inyección. A las 8 y 24 horas se realizarán otros estudios en la región donde se detecte el tumor.

Se me explicó, además, que en el brazo contralateral se me colocará un trocar para realizar extracciones de sangre de 6 mL cada una inmediatamente posterior a la inyección, y luego a los 5 min, 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 24h, 48h y 72h. Por último, se coleccionará toda la orina excretada por mi, durante las primeras 72 h, posterior a la administración del producto, en frascos adecuadamente marcados para coleccionar la orina excretada entre la 0-2h, 2-8 h, 8-24h, 24-48h y 48-72h.

Que además se me extraerán 15-20 mL de sangre para análisis de laboratorio clínico (Hemograma, Leucograma con diferencial, plaquetas, TGP, fosfatasa alcalina y creatinina) antes de la inyección y en los días 7, 14 y 28 después de la misma. Se

realizarán estudios inmunológicos del fragmento de anticuerpo antes de la inyección y a las 2 semanas, 1, 3 y 6 meses después, extrayéndose cada vez 3 mL de sangre adicionales. Otros 3 mL de sangre se me tomarán antes de la inyección para medir CEA. Para todas las tomas de muestra después de las 72 horas de ingreso deberé asistir al Instituto.

Recibiré, de ser necesario, medicamentos para el tratamiento de los posibles efectos secundarios, si estos ocurrieran, como por ejemplo: dipirona, antieméticos, etc, que serán administrados por profesionales plenamente capacitados para esto.

Todo lo anterior es necesario para evaluar la toxicidad, la biodistribución, el grado de positividad gammagráfica y la farmacocinética del producto.

5. Beneficios esperados

Se justifica por la búsqueda de un nuevo procedimiento diagnóstico y terapéutico. Mi participación en este ensayo pudiera permitir realizar un mejor diagnóstico, lo cual redundará en un beneficio general en el tratamiento y seguimiento de la enfermedad. Además, de ser eficiente el marcaje tumoral con este fragmento de anticuerpo, pudiera permitir mejoras terapéuticas futuras al aplicar el mismo con una mayor carga radioactiva o unirlo a otras sustancias radioactivas o compuestos con propiedades terapéuticas. También se me aclaró que cualquier nuevo adelanto científico durante el tratamiento de mi enfermedad (medicamentos, investigaciones, etc.) que pudiera beneficiarme, se me tomaría en cuenta inmediatamente. Durante los estudios estaré en estrecha vigilancia de mis médicos investigadores y enfermeras.

6. Riesgos e inconvenientes

Se me informó que en los estudios realizados en animales con este producto se administraron dosis hasta 90 veces superiores que la máxima que se me podrá administrar (1 mg), sin que aparecieran efectos tóxicos de acuerdo con los resultados de las investigaciones realizadas.

Se me explicó que este producto será marcado con una sustancia radioactiva, el ¹³¹I, y que la dosis de radiación que recibiré será tan baja que no se espera que la administración del mismo provoque algún efecto negativo secundario por exposición a radiaciones ionizantes. Que las molestias más frecuentes serán las provenientes de la canalización de las venas. Para esto se dispone mochas y trocares de alta calidad y de un personal muy bien entrenado.

En cuanto a los efectos secundarios, estos siempre han sido escasos o no se produjeron en estudios realizados con productos de origen similar al que se me

administrará. No obstante es posible que pueda presentar reacciones adversas, caracterizadas fundamentalmente por náuseas, vómitos, dolor de cabeza, fiebre, dolor en el pecho o malestar general. Estos síntomas, generalmente, si aparecen, son en las primeras 2 horas, posteriores a la administración del producto, tiempo que estaré bajo vigilancia médica altamente capacitada para aplicarme las medidas y medicamentos previamente establecidos, con el objetivo de disminuir o abolir los posibles efectos desagradables.

7. Compensación

Como ciudadano cubano, tengo derecho a toda la asistencia médica gratuita que garantiza nuestro Sistema Nacional de Salud. Esto incluye los ingresos, atención médica, medicamentos convencionales que fueran necesarios y, además el producto ensayado, investigaciones, etc. Mi incorporación a este ensayo será sin costo para mí. En estos estudios no existe compensación económica.

8. Derechos

Se me ha informado que tengo derecho a recibir una copia de este consentimiento informado, además, que en cualquier momento puedo abandonar el ensayo clínico, sin dar explicaciones y sin que por ello se afecte mi relación con el Instituto, mis médicos y enfermeras de asistencia, así como, la posibilidad de recibir cualquier tipo de tratamiento convencional que se plantee, ni otros cuidados posteriores que yo deba recibir. También se me informó que puedo preguntar a los investigadores, cuyos datos se exponen al pie de este documento, por los pormenores de este ensayo, y decidir por la información recibida si continuo o no en el mismo. Que también tengo derecho a ser informado cada vez que se realice una enmienda o modificación en el ensayo clínico en que participo, y que esta debe contar con mi consentimiento, avalado con mi firma.

9. Confidencialidad

Se me explicó que los datos sobre mi persona serán guardados de forma confidencial, y a ellos solo tendrán acceso las siguientes instancias: investigadores, promotor, agencia reguladora e Instituto de Oncología y Radiobiología (INOR). Se mantendrá reserva absoluta sobre el uso de medicamentos, de mis hábitos tóxicos y de otros estudios en que haya participado. En mi historia clínica hospitalaria, se señalará mi participación en este estudio.

10. Voluntariedad

Después de haber escuchado y analizado toda la información anterior puedo afirmar y resumir lo siguiente:

- Mi decisión voluntaria de participar en este ensayo clínico.
- Solo Género Femenino: Como paciente femenina en edad reproductiva y en pleno juicio de mis facultades acepto realizarme la prueba de embarazo, que se me aconseja que debo emplear métodos anticonceptivos por un período de 6 meses posterior a la aplicación del ¹³¹I, y que de salir embarazada durante ese período debo asistir a una consulta de Genética Médica para descartar algún peligro para el feto o para mi vida.
- No padezco de alergia o hipersensibilidad al yodo.
- He tenido tiempo suficiente para decidir mi participación, así como, de preguntar todas mis dudas.
- Estoy de acuerdo en los acápites de la presente información.

II.

CONSENTIMIENTO

ESCRITO

- Se me ha explicado de forma oral y escrita, todos los detalles de mi participación en el ensayo clínico “Evaluación de un fragmento multivalente de anticuerpo anti-CEA radiomarcado en pacientes con adenocarcinoma colorectal”.
- He oído, leído y comprendido la información arriba detallada.
- He podido hacer preguntas y evacuar dudas sobre el estudio.
- Mi participación es completamente voluntaria, y puedo retirarme en cualquier momento del mismo, sin tener que dar explicaciones y sin que ello repercuta en mi atención médica.
- En caso necesario, para preguntas, dudas, etc., puedo dirigirme a los médicos investigadores siguientes: Dr. Juan P. Oliva González, Dra. Nery González Lazo, INOR, calle 29 y F, Vedado, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Teléfonos: 55 2594 ó 55 2578-83.
- Puedo además para mejor información acudir a los miembros del Comité de Ética del INOR, encargados de la revisión y aprobación de esta investigación y de proteger mis derechos.
- El presente ensayo clínico es organizado y financiado por el CIGB y el Ministerio de Salud Pública (MINSAP). El médico que conduce la investigación no recibirá pago extra por ello. Ud. recibirá una copia de este formulario.
- Doy mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: _____

Participante: _____
Nombre y apellidos firma

Médico: _____
Nombre y apellidos firma

Testigo: _____
Nombre y apellidos firma

Publicaciones del Autor Contenidas en el Documento de Tesis.

Lincidio Pérez, Marta Ayala, Gilmara Pimentel, Hanssel Bell, Leonardo Canaán-Haden, Mónica Bequet, Luis Javier González, Marlen Miranda, Rolando Ravelo, Lourdes Roque, Boris Acevedo, Juan P. Oliva, and Jorge V. Gavilondo. (2006) A Multivalent Recombinant Antibody Fragment Specific for Carcinoembryonic Antigen. *Biotechnology Applied Biochemistry* 43. 2006:39-48.

Pimentel G., Ravelo R., **Pérez L.**, Ayala M., Miranda M., Sánchez I., y Gavilondo J. (2007) Diabody construct of ior-CEA.1. Pre-clinical studies for therapeutical application. *World Journal of Nuclear Medicine*. 6(S1): S33-S34.

Lincidio Pérez, Gilmara Pimentel, Rolando Ravelo, Marta Ayala, Hanssel Bell, Marlen Miranda, Yania R. Martínez, Iraida Sánchez, Alexis Musacchio, Vivian Morera, Leonardo Caanan, Juan P. Oliva and Jorge V. Gavilondo. (2008) Biochemical characterization and tumor targeting properties of an anti-CEA non covalent dimeric recombinant antibody scFv fragment produced in *E. coli*. *Minerva Biotecnologica* 20(3): 103.

Patente

CU-2002-0086: Fragmentos de Anticuerpo Específicos para el Antígeno Carcinoembrionario Humano (CEA).

Otras publicaciones del Autor vinculadas el tema de tesis:

Ayala M, Dueñas M, Santos A, Vázquez J, **Pérez L**, Menéndez A, Silva A, and Gavilondo JV. (1993) Bacterial recombinant scFv fragments of a mouse monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen. *Biotecnología Aplicada*. 10[2]: 81-2.

M. Dueñas, J. Vázquez, M. Ayala, E. Soderlind, M. Ohlin, **L. Pérez**, C.A.K. Borrebaeck and J.V. Gavilondo. (1994) Intra-and Extra cellular Expression of an scFv Antibody Fragment in *E. coli*: Effect of Bacterial Strains and Pathway Engineering Using GroES/L Chaperonins. *BioTechniques*, Vol. 16(3): 476-7, 480-3.

Vázquez JE, **Pérez L**, Ayala M, Canaán-Haden L, and Gavilondo JV. (1995) Bacterial expression and characterization of a modified scFv fragment from the anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody CB. CEA.1. *Biotecnología Aplicada*. 12(2): 96-7.

L. Pérez, J. Vázquez, M. Ayala, A.G. Siccardi, E. Tresoldi, C. de Lalla, J.V. Gavilondo and A. Sidoli. (1996) Production, Purification and Characterization of an anti-(carcinoembryonic antigen) recombinant single-chain Fv antibody fragment *Biotechnology Appl. Biochem.* 24: 79-82.

Otras Publicaciones del Autor:

- Duarte C., **Pérez L.**, Vazques J., Dueñas M., Vilarrubia O., Navea L., Valdés R., Reyes O., Montero M., Ayala M.y Gavilondo J.V. (1996) Epitope mapping, V-region DNA sequence, and neutralizing Fab fragments of two monoclonal antibodies against the HIV-1 V3 loop. *Immunotechnology*. 2(1): 11-20.
- Corti A., **Pérez L.**, Gasparri A., Curnis F., Longhi R., Brandaza A., Siccardi A. and Sidoli A. (1997) Production and structure characterisation of recombinant chromogranin A N-terminal fragments (vasostatins) Evidence of dimer-monomer equilibria. *European Journal of Biochemistry*. 248: 692-699.
- Gasparri A., Sidoli A., **Pérez L.**, Longhi R., Siccardi A., Marchisio P.C., Corti A. (1997) Chromogranin A fragments Modulate cell adhesion: Identification and Characterization of a pro-adhesive domain. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(33): 20835-20843.
- Lincidio Pérez Sánchez**, Raul Yovan Concepcion Lorenzo, Edel Torres Gomez, Reinaldo Blanco Aguila, Nicasio Abad y Mario Veliz. (2002) Aislamiento y Purificación de una glicoproteina asociada a la gestacion del ganado bovino. *Revista INFOCIENCIA*, volumen 6, No 3.
- Meilyn Rodriguez, Nadia I. Ramirez, Marta Ayala, Freya Freyre, **Lincidio Pérez**, Ada triguero, Cristina Mateo, Guillermo Selma-Housein, Jorge V. Gavilondo, Medardo Pujol. (2005) Transient Expresión in Tobacco Leaves of Aglycosylated Recombinant Antibody Against the Epidermal Growth Factor Receptor. *Biotechnology and Bioengineering*. 89(2): 188-194.
- Aniel Sanchez, Yassel Ramos, Yanni Solano, Luis Javier Gonzalez, Vladimir Besada, Lázaro Betancourt, Jeovanis Gil, Felix Alvarez, Meilyn Rodriguez, **Lincidio Pérez**, Merardo Pujol and Gabriel Padrón. (2007) Double acylation for identification of amino-terminal peptide of proteins isolated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 21: 2237-2244.
- Merardo Pujol, Jorge Gavilondo, Marta Ayala, Meilyn Rodríguez, Ernesto M. Gonzalez and **Lincidio Pérez**. (2007) Fighting cancer with plant-expressed pharmaceuticals. *Trends in Biotechnology*. 25/10: 455-459.