

# MARCACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL IOR-CEA1 CON $^{131}\text{I}$ POR EL MÉTODO DE LA CLORAMINA T, PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS RELACIONADAS CON EL ADENOCARCINOMA EMBRIONARIO.

## REPORTE PRELIMINAR

Koga R. <sup>(1)</sup> [rkoga@ipen.gob.pe](mailto:rkoga@ipen.gob.pe); Vásquez S. <sup>(2)</sup> [svasquez@ipen.gob.pe](mailto:svasquez@ipen.gob.pe);  
Otero M. <sup>(1)</sup> [motero@ipen.gob.pe](mailto:motero@ipen.gob.pe); Caballero J. <sup>(1)</sup> [icaballero@ipen.gob.pe](mailto:icaballero@ipen.gob.pe);  
Herrera J. <sup>(1)</sup> [jherrera@ipen.gob.pe](mailto:jherrera@ipen.gob.pe)

(1) *Planta de Producción de Radioisótopos –PPR-RAIS – IPEN / Lima-Perú*

(2) *Dirección General de Promoción y Desarrollo Tecnológico-PRDT – IPEN / Lima-Perú*

## RESUMEN

El Anticuerpo Monoclonal (AcMo) IOR-CEA1 es considerado como un marcador tumoral para cáncer al colon y recto principalmente. Con ayuda de las técnicas nucleares se ha logrado marcar el radioisótopo  $^{131}\text{I}$ , que se produce en la Planta de Producción de Radioisótopos del IPEN. El AcMo IOR-CEA1 con el  $^{131}\text{I}$ , fue marcado inicialmente según la técnica de la Cloramina T, descrita en la "Guía de radioiodonización de Amersham Life Science", donde no se obtuvieron resultados favorables y por esa razón se realizaron variantes, debido a que no se ligaba el anticuerpo con el  $^{131}\text{I}$ , por lo que se modificó esta técnica aumentando el tiempo de incubación y concentración del agente oxidante (Cloramina T), lo que dio como resultado porcentaje promedio de pureza en radioquímica un porcentaje promedio (PQR) del 97,57%  $\pm$  1,53, además se evaluó la estabilidad de la molécula teniendo como resultado que hasta el sexto día de la post-marcación presenta una PRQ >90%.

## ABSTRACT

The Monoclonal antibody (AcMo) IOR-CEA1 is considered a tumor marker for colon and rectal cancer. With the aid of nuclear techniques it was to label with the radioisotope  $^{131}\text{I}$  that is produced in the Plant of Production of Radioisotopes in IPEN. The monoclonal antibody according to the techniques of the Chloramine T, described in the 'Guide of radioiodination of Amersham life'. We did not obtained a good result and for this reason we made modifications due to that the antibody with

the  $^{131}\text{I}$  was tied, in this technique of the oxidant agent (Chloramine T), was incubated for more time and the concentration was increased too. Having as a result in the radiochemical purity (PQR) a percentage average of the 97,57% $\pm$ 1,53; also the stability of the labelled molecule was evaluated having as a result that until the sixth day of the post-labelled we had a molecule with a PQR > 90%.

## 1 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1. Anticuerpo monoclonal a utilizar

El Anticuerpo Monoclonal (AcMo) a utilizar en este trabajo de investigación es el IOR-CEA1, anticuerpo murino antígeno carcino embrionario, se caracteriza por tener una alta especificidad y sensibilidad en el seguimiento de pacientes con cáncer colorectal. Este reactivo fue donado por el OIEA, a través del proyecto ARCAL LII del IPEN.

### 1.2. Método de marcación

#### **Materiales:**

$\text{Na}^{131}\text{I}$  100 mCi/mL, para diluir se utiliza Buffer fosfato 0,25M pH=7,5; 2 mg/mL de Cloramina T, 2,4 mg/mL de L-Cysteina, 0,5 – 1,0 mg/mL de IOR-CEA1 todas los reactivos y se diluye con Buffer Fosfato 0,05M pH=7,5.

#### **Método de marcación:**

0,5-1,0 mCi (5-10uL) de  $\text{Na}^{131}\text{I}$ , dispensado en un tubo de poliestireno, agregue rápidamente a este tubo de poliestireno 50 a 100uL de una solución Buffer Fosfato

0,25 M pH = 7,5. Se homogeniza con la ayuda de un vortex, luego se adiciona 10uL (5 a 10ug) de la solución del AcMo IOR-CEA1, luego agregar 25µL de Cloramina T e incubar por 60 segundos y para detener la reacción de oxidación se le agrega 50uL L-cysteina.

Luego, se toma toda la solución y se vierte a una columna PD-10 (que previamente ha sido lavada con una solución Buffer Fosfato 0,05 M). Una vez colocada la solución dentro de la columna PD-10, se lleva a un calibrador y se mide la actividad (Actividad Inicial).

Después se agrega una solución buffer Fosfato 0,05M que contiene 2% de albúmina bovina y se colecta la muestra mililitro por mililitro, dentro de unos tubos de vidrio. Aproximadamente se colectan 20 muestras, cada tubo se lleva al calibrador, para poder ubicar la molécula marcada.

Luego, se mide la actividad de la columna PD-10 para determinar el porcentaje de retención que hay en la columna.

### 1.3. Control de la pureza radioquímica

Tomar aproximadamente 0.1 mL de la molécula marcada y colocarlo en una tira de papel Whatman N° 1, previamente secadas en una estufa a 70 °C por 30 minutos aproximadamente, adicionarle una gota de portador (NaI) a la tira de papel con la finalidad de tener una mejor separación y en una probeta de 500 mL. se coloca 100 mL de Metanol al 85% (Fase móvil), Se coloca la tira con la muestra sujeta con un gancho de jebe dentro de la probeta; dejando correr el solvente hasta alcanzar una altura adecuada (como mínimo 10 cm.)

Alcanzada la altura, sacar las tiras y colocarlas sobre papel absorbente y llevar a secar al horno entre 70 a 80 °C por un tiempo de 5 a 10 minutos, una vez secas las tiras, son llevadas a contar a un equipo contador de pozo.

Se procede a cortar con la ayuda de una tijera y una pinza, se coloca dentro de unos tubos de plásticos que a su vez estos tubos van dentro de un rak, colocarlo dentro del equipo contador automático Wizzard Wallac, que previamente está calibrado para contar  $I^{131}$ .

## CROMATOGRAFÍA ASCENDENTE

SOPORTE	Whatman n°1
SOLVENTE	Metanol 85%
Rf $I^{131}$ -AcMo	1,0
Rf $I^{131}$	10,0

LA PUREZA RADIOQUÍMICA > 90%

## 2 RESULTADOS

En total se han realizado siete pruebas con esta metodología de marcación obteniendo un Porcentaje de Pureza radioquímica (PRQ) del **97,57%±1,53** (tabla n°1).

También se pudo observar que en el lote 5 hay un descenso considerable con respecto a la PRQ (94,75%), esto se debe a que la columna PD-10 utilizada para la purificación de Anticuerpo monoclonal (AcMo) marcado se había saturado de impurezas, por lo que se procedió a recuperar la columna utilizando una solución de NaOH 1,0M, agregando a la columna de dos a tres veces el volumen total de la columna y posteriormente enjuagar la columna con una solución de Buffer Fosfato 0,05M con un pH=7,5.

Con respecto a la estabilidad, mediante este procedimiento de marcación se pudo comprobar que el IOR-CEA1 marcado con el  $I^{131}$  se encuentra por encima del 90% hasta el sexto día de la post-marcación. (Tabla 2), esta molécula fue almacenada en refrigeración de 4 a 8 °C en oscuridad.

**Tabla 1.** Resumen de las marcaciones del IOR-CEA1 con  $I^{131}$

LOTE DE PRODUCCION	PRQ(%)
Lote n°1	97,16
Lote n°2	98,15
Lote n°3	98,06
Lote n°4	99,30
Lote n°5	94,75
Lote n°6	96,59
Lote n°7	98,76
PROMEDIO	97,54±1,53

Especificación de Pureza Radioquímica > 90%

**Tabla 2.** Resumen de los controles de estabilidad de IOR-CEA1 con  $^{131}\text{I}$

DÍAS	Prueba nº1	Prueba nº2	Prueba nº3	Promedio
Día 1	97,38	94,15	94,08	95,20%±1,89
Día 2	95,75	93,26	93,30	94,10%±1,43
Día 3	94,62	91,06	92,60	92,76%±1,79
Día 4	93,36	90,45	91,96	91,92%±1,46
Día 5	92,51	89,89	91,12	91,17%±1,31
Día 6	91,62	89,11	90,84	90,52%±1,28
Día 7	90,31	88,98	89,89	89,73%±0,68
Día 9	89,62	88,63	89,57	89,27%±0,56
Día 9	88,64	88,48	89,03	88,72%±0,28

### 3 CONCLUSIÓN

En forma preliminar se puede mencionar que se ha estandarizado la metodología de marcación del AcMo IOR-CEA1 con el  $^{131}\text{I}$  por el método de la Cloramina T, con una buena estabilidad del producto, que permanece por encima de las especificaciones hasta el sexto día de la post-marcación.

Uno de los grandes problemas al trabajar con el  $^{131}\text{I}$  es que es un radioisótopo altamente energético y debido a esta energía se desliga muy fácilmente cualquier proteína, produciéndose radioiodonización, es por eso que con la ayuda de sustancias radioprotectoras, que en nuestro caso es la albúmina bovina al 2%, se pudo mantener que la PRQ se mantenga por encima del 90% hasta el sexto día.

### 4 REFERENCIAS

- [1] Avila A, Zamorano R, Pimentel G. Obtención y purificación de fragmentos de un anticuerpo monoclonal contra el antígeno carcinoembrionario, IOR-CEA. Rev. Inst. Cancerol. 2000; 46(30): 152-159.
- [2] Colturato M, Muramoto E, Da Silva C, Araújo B. Labelling of vasoactive intestinal peptide (vip) with 131-iodine. Preliminary biological distribution studies in animal. Alasbim Journal 2003. En : <http://www.alasbimjournal.cl/alasbim>
- [3] Guide radioiodination techniques.  $^{125}\text{I}$ . (1993). Amersham Life Science: 59-61
- [4] Lavinas T, Da Silva C, Araujo E. Direct labeling of chemotactic peptide for lefnyk with radioiodine. Alasbim Journal. 2003; 5(20). En: <http://www.alasbimjournal.cl/alasbim>
- [5] Perera A, Perez C. Radiomarcaje de anticuerpos con Tecnecio 99m. Rev. Esp. Med. Nuclear. 1998;17: 302-309.
- [6] Pimentel G, López O, Quezada W, Sanchez O, Oliva J. Desarrollo del IOR-CEA1 como agente potencial para la terapia del cáncer colorectal. Abstracts XVI ALASBIMN Congress Nuclear Medicine; 1999. En: <http://alasbimjournal/congress>
- [7] Riva P, Paganelli G, Benini S, Moscatelli G, Tison V. The choice of the proper labeling isotope in different types of tumor: Experience in patients with CEA expressing cancer using  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{I}$  and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  labeled monoclonal antibodies. Smicht; H.A.E. Csernanay, L. Editors. New trend and possibilities in the nuclear medicine Stuttgart: Germany. Scahutter 870:560-565.