

# Desarrollo de un kit liofilizado de anti-egf/r3 para ser marcado con Tc-99m obtenido por extracción, para uso potencial en inmunogammagrafia. Reporte preliminar

Guilmer Agurto<sup>(1)</sup> [gagurto@ipen.gob.pe](mailto:gagurto@ipen.gob.pe); Ingrid Petzoldt<sup>(1)</sup> [ipetzoldt@ipen.gob.pe](mailto:ipetzoldt@ipen.gob.pe);  
Anita Robles<sup>(1)</sup> [arobles@ipen.gob.pe](mailto:arobles@ipen.gob.pe); Bertha Ramos<sup>(1)</sup> [bramos@ipen.gob.pe](mailto:bramos@ipen.gob.pe);  
Julia Ramirez<sup>(1)</sup> [jramirez@ipen.gob.pe](mailto:jramirez@ipen.gob.pe); Mario Morote<sup>(1)</sup> [mmorote@ipen.gob.pe](mailto:mmorote@ipen.gob.pe)

(1) IPEN, Planta de Producción de Radioisótopos, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

## Resumen

Este estudio reporta los primeros resultados preliminares de 03 lotes producidos en solución. Se utilizó 2-Mercapto Etanol en la reducción del anticuerpo (relación de 1:2000 de AcMn:2ME) con un tiempo de incubación de 30 minutos, la purificación se realizó en columna PD 10. Se probaron tres formulaciones usando como ligando el MDP, como anticuerpo el ior-EGF/ R3 y fluoruro estañoso. Las tres formulaciones tuvieron diferentes variaciones en las cantidades de AcMn y Fluoruro estañoso. Para la marcación se empleo Tc 99m con actividades de 2 y 28 mCi. La determinación de la pureza radioquímica (PRQ) se realizó en ITLC-SG con un resultado promedio de 95 % marcado a bajas actividades. El resultado de PRQ con altas actividades fue del 93%, con la finalidad de elevar este porcentaje se incrementó en 25 y 50 % la cantidad de fluoruro estañoso obteniendo como resultado 98.5% de PRQ. Los próximos lotes a producir servirán para confirmar estos resultados preliminares y en una segunda etapa producir lotes liofilizados, evaluar la determinación de grupos tioles, inmunoreactividad, desafío con cisteína, soporte de actividad, así como su estabilidad post-producción.

## 1. Introducción

El uso clínico de los anticuerpos monoclonales ha obtenido una gran importancia en los últimos cinco años.

El Anticuerpo Monoclonal (AcMn) anti receptor 3 del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF/R3) marcado con Tc 99m se utiliza en la medicina nuclear debido a su gran especificidad en la identificación del receptor EGF-R, el cual se expresa altamente en tumores de origen epitelial. Actualmente en nuestro país no se produce un kit liofilizado de Anti-egf/r3 para ser marcado con Tc 99m, por tal motivo el desarrollo este trabajo tiene como objetivo la estandarización del kit liofilizado para su disponibilidad en el mercado nacional.

En esta etapa preliminar la producción se realizó en solución, el método de marcación que se utilizó fue el método directo desarrollado por Schwarz y Steinstrasser y modificado posteriormente por Mather y Ellison el cual ha demostrado que es posible obtener una elevada eficiencia de marcación del AcMn.

## 2. Método Experimental

### 2.1 Anticuerpo Monoclonal a utilizar

El Anticuerpo Monoclonal (AcMn) que se está utilizando en este trabajo es el IOR-EGF/R3, anticuerpo murino que reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico con alta afinidad. Este reactivo es donado por el OIEA, a través del proyecto ARCAL LII.

### 2.2 Reducción, Purificación y Formulación

#### Materiales:

10 mg de AcMn (ior EGF/R3), 10 uL de 2Mercapto Etanol, 11.9 mg SnF<sub>2</sub>/50 mL H<sub>2</sub>O, 8.0 mg MDP/4mL NaCl, PBS 0.1M, columna PD10.

#### Método:

Hacer reaccionar el AcMn con el 2ME por 30 minutos, purificar el AcMn reducido en una columna de PD10, verter PBS nitrogenado sobre el lecho de la columna PD10 y coleccionar fracciones de 1.0 mL hasta completar 10 fracciones. Tomar alícuotas de 100 uL de cada fracción diluir en 900 uL de PBS y determinar la concentración de proteína mediante espectrofotometría UV. Coleccionar en beaker las fracciones correspondientes a concentraciones mayores a 0.8mg/mL, fraccionar a razón de 1.0 mg del AcMn-EGF reducido y purificado en viales.

Preparar las soluciones de SnF<sub>2</sub> y MDP, mezclar 3 mL de cada solución y adicionar 50 uL de la solución resultante a cada vial del AcMn-EGF reducido y purificado. Precintar y mantener en refrigeración.

### 2.3 Control de la Pureza Radioquímica

Se realizaron controles a bajas y altas actividades (2 y 28 mCi).

Tomar aproximadamente en 1 mL de Tc 99m la actividad requerida y agregar en el vial que contiene el Anti EGF/R3, dejar reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente, sembrar una alícuota en tres tiras de ITLC-SG, previamente activadas a 70°C por 60 minutos aproximadamente, colocar cada tira en los siguientes solventes: NaCl 0.9%, Acetona y mezcla de etanol-amoniaco-agua (2;1:5), el conteo se realizó en el contador gamma automático Wizzard Wallac.

### CROMATOGRAFÍA ASCENDENTE

Especie radioquímica	SF	Rf	
		Acetona o MEC	Etanol:amoniaco:H <sub>2</sub> O
<sup>99m</sup> Tc red. e hidrolizado	0,0	0,0	0,0
<sup>99m</sup> Tc-AcM	0,0	0,0	0,7-0,8
<sup>99m</sup> Tc-MDP	0,9 - 1,0	0,0	0,9 - 1,0
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> -	0,9 - 1,0	0,9 - 1,0	0,9 - 1,0

### 3. Resultados

En total se han realizado 03 lotes en solución obteniendo un porcentaje de pureza radioquímica (PRQ) de 95% marcado con 2 mCi y de 93% marcado con 28 mCi. Incrementando en 25 y 50 % la cantidad de fluoruro estaño se obtuvo como resultado promedio de 98.5% de PRQ (Tabla 1 y 2).

**Tabla 1.** Variación en la Cantidad de AcMn.

Actividad de marcación	Lote 01			Lote 02		
	28 mCi			2 mCi		
Cant. proteína por vial, mg	1	2	3	1	2	3
% <sup>99m</sup> Tc-AcMn	-	92.6	93.6	93.95	95.2	96.1
%TcO <sub>4</sub>	-	6.6	6.1	5.5	3.61	3.44

**Tabla 2.** Variación en cantidad de SnF<sub>2</sub>

Resultados de PRQ	Cantidad aumentada de Estaño	
	+ 25%	+ 50%
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub>	0.50 %	1.8 %
<sup>99m</sup> TcO <sub>2</sub>	0.2 %	0.31 %
<sup>99m</sup> Tc-AcM	99.3 %	97.7 %

### 4. Discusiones

- La variación de la cantidad de AcMn se realizó para evaluar el comportamiento del Kit respecto a su PRQ, con lo cual el aumento desde 1 a 3 mg de AcMn indican que esta variación no tiene gran incidencia en los resultados de PRQ.
- La cantidad de SnF<sub>2</sub> se incremento en un 25 y 50% de su cantidad inicial de formulación con lo cual se mejoro el rendimiento de la PRQ (ver tabla N°2).

### 5. Conclusiones

- Los resultados de estos tres primeros lotes muestran que la cantidad de proteína por vial no tiene una significativa relevancia en los resultados de PRQ por lo tanto se continuará realizando los ensayos con 1 mg de AcMn.
- Aumentar la cantidad de fluoruro de estaño entre 25 y 50% en los próximos lotes.
- Continuar los ensayos con la última formulación a fin de determinar su reproducibilidad, soporte de actividad y estabilidad post- producción de lotes liofilizados.

### Bibliografía

- [1] A. Morales, F. Zayas, G. Núñez, I. Escobar, N. Perez, I. Hernández. Technetium 99m Direct Radiolabeling of Monoclonal Antibody ior egf/r3. Nucl. Med. Vol.25, pp 25-30, 1998.
- [2] A. Morales, N. Pérez, G. Núñez, I. Caballero, J. Ducongé, E. Fernández, A. Veloso, A. Paz, N. Iznaga. Freeze-dried Formulation for the Direct <sup>99m</sup>Tc-labeling of ior egf/r3 Monoclonal Antibody: Equivalence Studies. Biotecnología Aplicada 2000; Vol. 17 No. 1, pp. 39-44.
- [3] Protocolo modelo para la preparación, control de calidad de radiofármacos basados en anticuerpos monoclonales. Proyecto ARCAL LII, 2002.