

# RADIOMARCADO DE PÉPTIDOS PARA DIAGNÓSTICO Y TERAPIA

**Laura Meléndez Alafort**

Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México  
Paseo Tollocan s/n esquina con Jesús Carranza, Colonia Moderna de la Cruz, Toluca,  
Edo. de México, C.P. 50180. E-mail: lalafort@nuclear.inin.mx

## 1. Resumen

Muchos tipos de tumores humanos presentan altos niveles de receptores de somatostatina. El objetivo de la radiofarmacia es aplicar esta información para obtener imágenes moleculares capaces de diagnosticar este tipo de alteraciones oportunamente.

En los últimos años, el interés en radiofármacos se ha enfocado a síntesis de péptidos radiomarcados, debido su capacidad única para detectar sitios bioquímicos específicos tales como receptores y enzimas. En este trabajo se presentan algunas de las estrategias más comunes utilizadas en el radiomarcado de péptidos para diagnóstico, las ventajas y desventajas de cada uno de ellos, así como los resultados clínicos obtenidos. Además se presentan algunos estudios preliminares sobre la síntesis de radiofármacos terapéuticos para el tratamiento de cánceres que presenten receptores de somatostatina.

## 2. INTRODUCCIÓN

Con la reciente obtención de la secuencia estructural completa del genoma, la visión general es aplicar esta información para obtener imágenes moleculares capaces de diagnosticar alteraciones fenotípicas del cuerpo humano. Debido a que estas alteraciones pueden indicar cambios importantes en atributos mensurables, por ejemplo la actividad enzimática o en las concentraciones de receptores de las células, éstos cambios podrían ser estudiados y utilizados con fines terapéuticos en el futuro<sup>1</sup>.

Desde sus inicios la química de los radiofármacos se ha dirigido al estudio de la química molecular. Actualmente, el futuro de la medicina nuclear diagnóstica y terapéutica está basado en la capacidad única que tienen algunos radiofármacos como los péptidos radiomarcados, para detectar sitios bioquímicos específicos tales como receptores y enzimas. Dado la alta actividad específica con que pueden ser marcados estos péptidos, y la alta sensibilidad de los equipos de detección externa de la radiación, es posible realizar imágenes moleculares que proporcionen mediciones precisas de los sistemas bioquímicos sin perturbarlos.

Durante las últimas 3 décadas, los anticuerpos monoclonales (Mabs) específicos marcados con radionúclidos, han sido ampliamente estudiados con fines terapéuticos y diagnósticos<sup>2-4</sup>. Sin embargo, la mayoría han demostrado problemas asociados con su tamaño, inmunogenicidad o debido a una relación muy baja de captación al sitio blanco en comparación con tejido normal. Se pensó entonces que usando fragmentos de anticuerpos (alrededor del 50 % más pequeños que los Mabs) se podría minimizar este tipo de problemas. Sin embargo, la difusión de estos fragmentos continúa siendo limitada debido a su gran peso molecular<sup>5</sup>. Los péptidos en cambio, por ser cadenas de aminoácido mucho más pequeñas, son más fáciles de sintetizar y con mucho menos probabilidad de crear una respuesta inmunogénica. Además, los péptidos presentan la ventaja de que pueden ser eliminados rápidamente del flujo sanguíneo dando como resultado una relación órgano blanco/tejido normal alta en un período de tiempo corto. Y por si fuera poco, en muchos casos la afinidad de los péptidos por sus receptores es mucho mayor que la de los fragmentos de anticuerpos por sus epítomos<sup>6, 7</sup>.

Todas estas consideraciones, hacen a los péptidos una opción más real para el diagnóstico y la terapia que los Mabs y sus fragmentos, y por lo tanto, el desarrollo actual de la radiofarmacia está enfocado en ellos.

### 3. Marcado de péptidos

Los péptidos pueden actuar como mensajeros químicos, neurotransmisores, estimuladores muy específicos o inhibidores regulando una gran variedad de funciones vitales<sup>5</sup>.

Existen numerosos métodos para marcar péptidos, principalmente adaptados de los métodos para marcar Mabs. Sin embargo el efecto del marcado en el comportamiento biológico del péptido es más drástico que con los Mabs debido al menor número de sitios disponibles para el marcado. Por tanto, es necesario estudiar y seleccionar adecuadamente el método que será utilizado para marcarlos ya que existe una alta probabilidad de que se modifiquen residuos aminoácidos esenciales para la actividad biológica<sup>5</sup>.

Los dos tipos de estrategias más utilizadas son la del marcado directo e indirecto<sup>8</sup>. Para el marcado directo se utilizan agentes reductores capaces de producir especies electrofílicas de los átomos radiactivos los cuales reaccionan con grupos funcionales del péptido<sup>7, 9, 10</sup>. El ejemplo más común es el marcado con  $^{99m}\text{Tc}$  el cual se une a los tioles formados por la reducción de los puentes disulfuro (figura 1). La mayor ventaja del marcado directo es la facilidad con que se lleva a cabo la reacción. Sin embargo este método solo sería aplicable a aquellos péptidos cuyos residuos de cisteína forman un ciclo, y debido a que la ciclización del péptido muchas veces es indispensable para proveer la configuración necesaria para ser reconocido por el receptor, existe una alta posibilidad de inactivar al péptido con el marcado directo<sup>8</sup>.

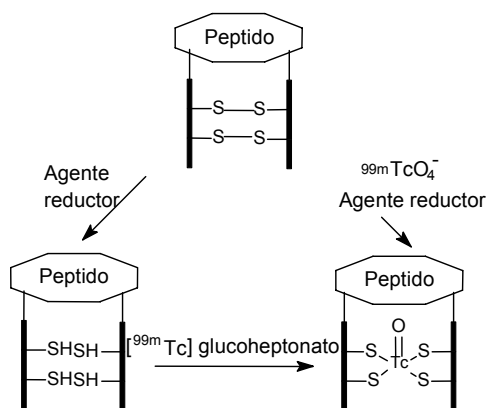


Figura 1 Marcado Directo con  $^{99m}\text{Tc}$

El marcado indirecto es un poco más complejo, ya que requiere de pequeñas moléculas, capaces de unirse por un lado al péptido y por el otro al átomo radiactivo, llamadas agentes bifuncionales (figura 2)<sup>8</sup>.

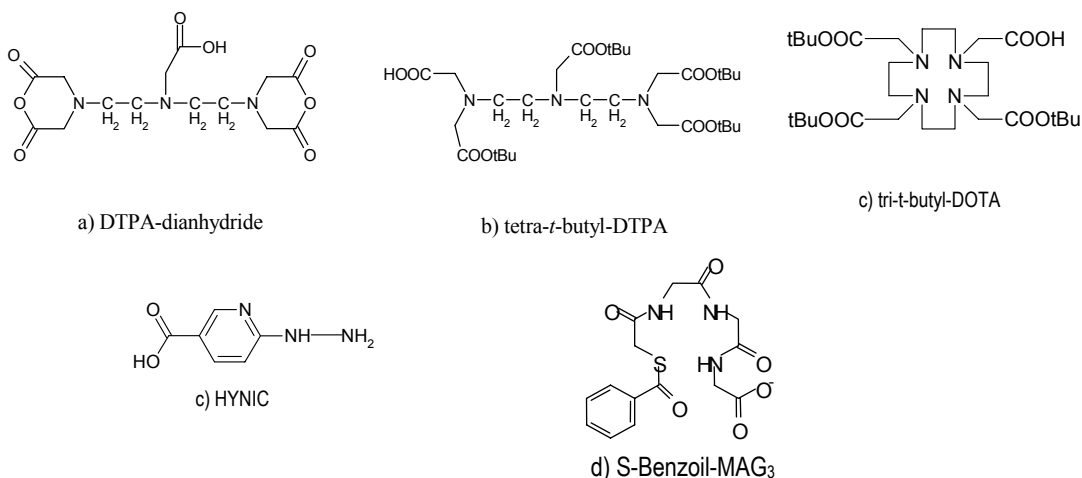


Figura 2. Algunos de los agentes biofuncionales utilizados en la conjugación de péptidos.

El marcado indirecto se puede realizar por dos métodos, marcado por pre-conjugación, y post-conjugación. En la pre-conjugación, el agente quelante es radiomarcado antes de ser conjugado al péptido, con el fin de no exponer al péptido a condiciones extremas de temperatura o pH usadas algunas veces para llevar a cabo el marcado. En caso de existir más de un grupo reactivo en el péptido, al marcar por este método es necesario protegerlos antes de la conjugación y desprotegerlos una vez terminada para evitar la formación de múltiples especies. Además como la mayoría de las reacciones no tiene una eficiencia del 100% es necesario purificar el producto del péptido no conjugado y del agente quelante radiomarcado remanentes (figura 3).

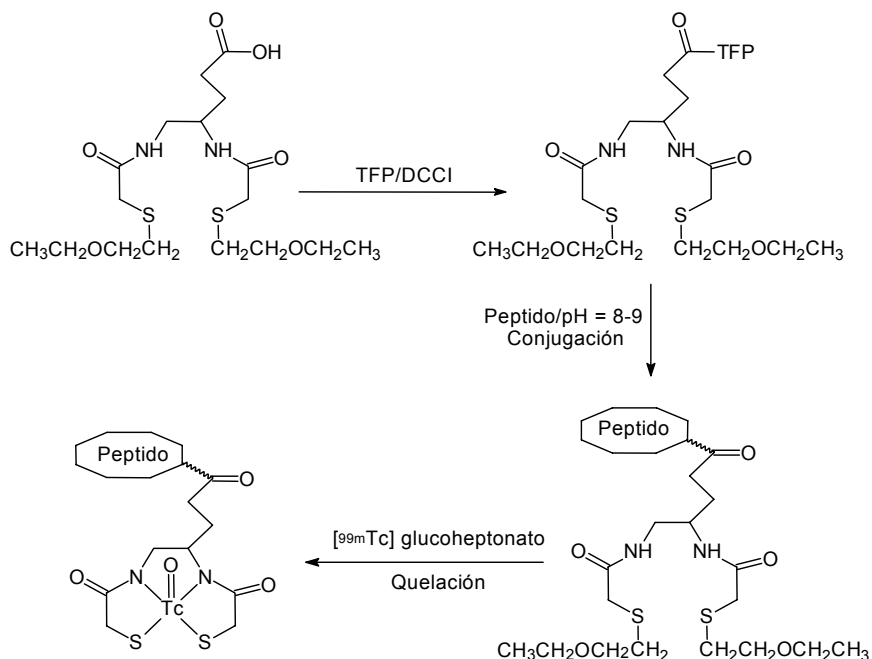


Figura 3. Marcado indirecto por pre-conjugación (TFP=tetrafluorofenol WS-DCCL Diciclihexilcarbodi-imida soluble en agua).

Para el marcado por post-conjugación el agente biquelante se conjuga al péptido, y posteriormente se marca el conjugado, debido a que este método generalmente da como resultado un solo producto no necesita ser purificado siendo mas práctico que el método anterior (figura 4).

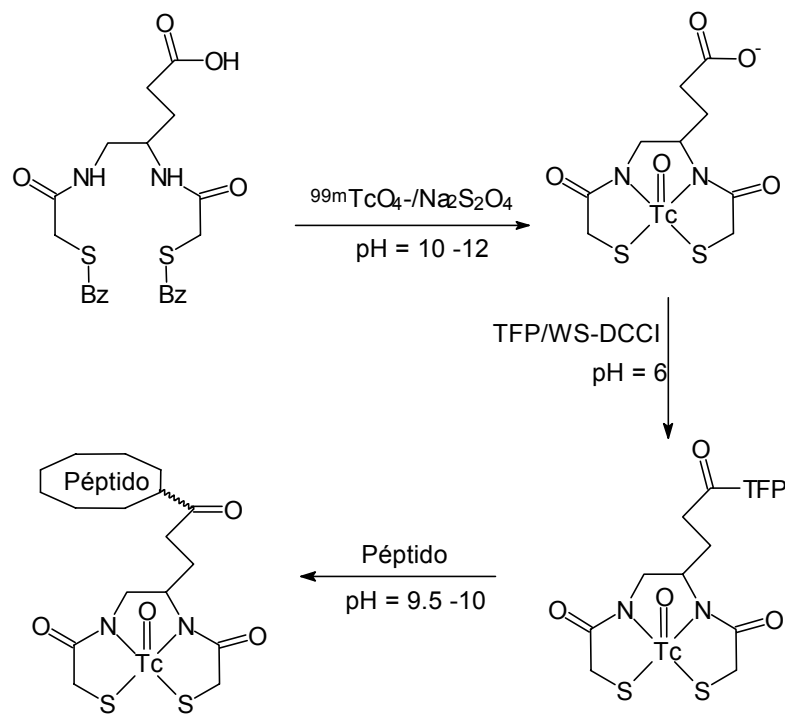


Figura 4. Marcado indirecto por post-conjugación (TFP=tetrafluorofenol WS-DCCL Diciclihexilcarbodi-imida soluble en agua).

#### 4. Péptidos análogos de somatostatina

La somatostatina es un tetradecapéptido regulatorio endógeno producido por el hipotálamo y el páncreas con una gran variedad de funciones. La función más importante de la somatostatina es inhibir la secreción de numerosas hormonas, como: insulina, glucagón, secretina y la hormona del crecimiento entre otras.

En la década de los 70 se descubrió que existen 5 sub-tipos de receptores capaces de reconocer la somatostatina (sst1-sst5) y que se encuentran presentes en una gran variedad de tumores y sus metástasis. Basados en este hecho en 1976 se hicieron los primeros intentos de marcar somatostatina para diagnóstico de estos tumores<sup>11</sup>, sin embargo los resultados fueron desalentadores debido a que el péptido es rápidamente degradado por las proteasas plasmáticas<sup>12</sup>.

Otros derivados con estructuras similares a la somatostatina fueron sintetizados y no sólo resultaron ser más estables si no que también mostraron un mayor efecto inhibitorio sobre los sistemas hormonales. Entre los análogos más comunes están Octreotide, Lanreotide<sup>13, 14</sup>, Tyr<sup>3</sup>-octreotide (TOC)<sup>15, 16</sup>, RC-160<sup>17-19</sup>, Tyr<sup>3</sup>-octreotate<sup>20</sup> (figura 5).

Somatostatin-14	Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys
Octreotide	D-Phe-Cys-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
Lanreotide	$\beta$ -D-Nal-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH <sub>2</sub>
Tyr <sup>3</sup> -octreotide (TOC)	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)
RC-160	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH <sub>2</sub>
Tyr <sup>3</sup> -octreotate	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr

Figura 5. Somatostatina y algunos derivados sintéticos.

El Octapéptido Octreotide (z) es actualmente el más usado para el tratamiento de tumores gastroenteropancreáticos, neuroendocrinos y acromegalias<sup>21</sup>. Debido a que el octreotide no puede ser marcado fácilmente con un radionúclido emisor gamma, se utilizó otro análogo TOC, el cual marcado con <sup>123</sup>I demostró ser útil para obtener imágenes de tumores<sup>22</sup>. Sin embargo presenta la desventaja de ser acumulado en la zona abdominal por el hígado, la vesícula biliar y el tracto gastrointestinal, dificultando la obtención de imágenes en esta área. Además de ser muy costoso debido a que el <sup>123</sup>I es un producto de ciclotrón<sup>23</sup>.

En busca de una solución a estos problemas, se encontró un mejor agente para imágenes de tumores abdominales el DTPA-octreotide marcado con <sup>111</sup>In<sup>24</sup>. Este producto se encuentra en el mercado actualmente, sin embargo la energía del <sup>111</sup>In no es la más adecuada para ser detectada por las gamma cámaras, y sigue siendo un producto de ciclotrón, por lo tanto costoso. El objetivo fue entonces tratar de marcar estos péptidos con Tc, debido a que éste puede ser obtenido de generador a mucho menor costo y puede ser detectado con mayor eficiencia por las gammacámaras dando imágenes con mayor definición que las del <sup>111</sup>In<sup>25</sup>.

El primer paso fue sintetizar un conjugado que contuviera un agente bifuncional capaz de ser marcado con <sup>99m</sup>Tc unido a un análogo de somatostatina como se muestra en la siguiente figura (figura 6).

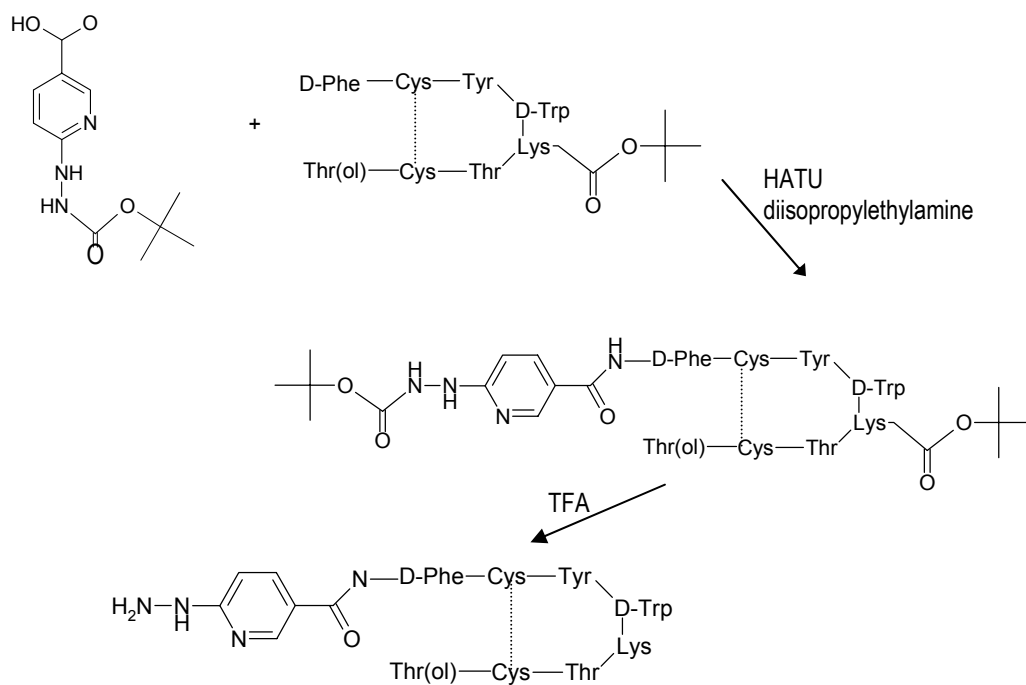


Figura 6. Síntesis del conjugado HYNIC-TOC.

El conjugado obtenido fue radiomarcado posteriormente utilizando diferentes agentes (ácido etilendiamino diacético (EDDA), ácido nicotínico, y tricina) coligantes para completar la esfera de coordinación (figura 7).  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC utilizando EDDA como coligante demostró ser la mejor opción para la detección de tumores que presentan receptores de somatostatina, ya que es captado rápidamente y retenido por el tumor dando una relación órgano blanco/ tejido normal mucho mayor en menor tiempo que en los otros dos casos<sup>26, 27</sup>.

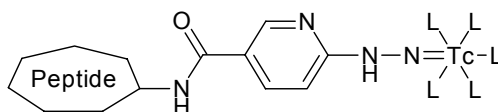


Figura 7. Esfera de coordinación del Tc- HYNIC-TOC.

Los estudios clínicos comparativos del  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC-EDDA y  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide demostraron tiempos de localización el tumor y parámetros de distribución muy similares, sin embargo la relación órgano blanco tejido normal fue mayor para el  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC-EDDA. Por lo tanto se concluyó que el  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC-EDDA tiene mejores propiedades para la identificación de tumores con receptores de somatostatina que el comercialmente disponible  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide (figuras 8 y 9)<sup>25</sup>.

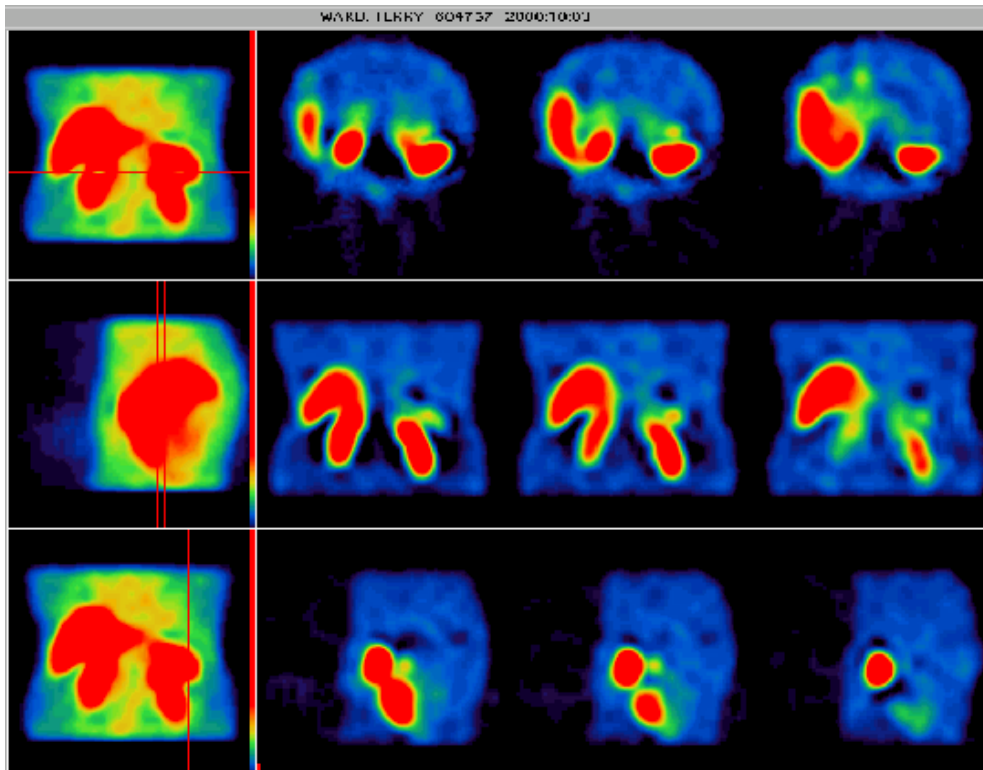


Figura 8. Imágenes de spect de un paciente 4 horas post-inyección de  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC-EDDA

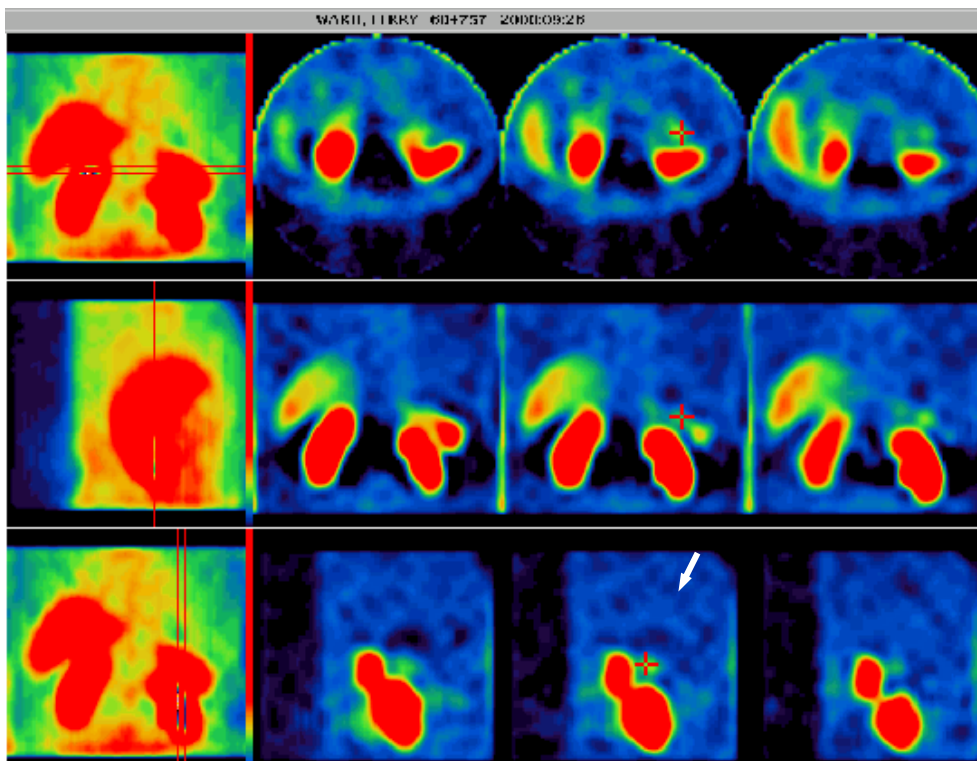


Figura 9. Imágenes de spect de un paciente 4 horas post-inyección de  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreotide

Debido a que  $^{99m}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC-EDDA resultó ser tan buen agente diagnóstico y, a que el renio presenta una química de coordinación muy similar a la del Tecnecio, se pensó que podría marcarse el conjugado HYNIC-TOC con  $^{188}\text{Re}$  (emisor beta) usando los mismos agentes colgantes y evaluar su potencial como radiofármacos terapéutico en el tratamiento de tumores con receptores de somatostatina. Se estudiaron efectos como concentración de los reactivos, pH y temperatura de incubación sobre la eficiencia de marcado y estabilidad del producto. La síntesis del complejo utilizando tricina como coligante resultó ser la de mayor eficiencia, sin embargo, no fue posible continuar con los estudios de biodistribución debido a que el producto obtenido es inestable a la dilución<sup>28</sup>.

Aún cuando el Tecnecio y el Renio tiene una química de coordinación similar, el complejo  $^{188}\text{Re}$ -HYNIC-TOC-EDDA no pudo ser sintetizado, tal vez debido al hecho de que el Re tiene mayor radio iónico que el Tc, haciendo mucho más difícil adoptar una estructura tridimensional similar.

Los tumores neuroendocrinos con receptores de somatostatina son sólo un ejemplo de los tumores que pueden ser detectados con gran eficiencia en la actualidad utilizando péptidos marcados. Sin embargo la tarea no está terminada, existe mucho por realizar en este campo, el objetivo primordial ahora es sintetizar complejos de péptidos marcados con emisores beta con una estabilidad y biodistribución adecuada no sólo para poder diagnosticar, si no para ser utilizados en la terapia del cáncer.

## 5. Referencias

1. Heppeler A, Froidevaux S, Eberle AN, Maecke HR. *Current Medicinal Chemistry* 2000;7:971-994.
2. Fonti R, Cheung NKV, Bridger GJ, Guo HF, Abrams MJ, Larson SM. *Nuclear Medicine and Biology* 1999;26:681-686.
3. Linder KE, Wen MD, Nowotnik DP, et al. *Bioconjugate Chemistry* 1991;2:407-414.
4. VanGog FB, Visser GWM, Klok R, vanderSchors R, Snow GB, vanDongen G. *Journal of Nuclear Medicine* 1996;37:352-362.
5. Fischman AJ, Babich JW, Strauss HW. *Journal of Nuclear Medicine* 1993;34:2253-2263.
6. Liu S, Edwards DS, Barrett JA. *Bioconjugate Chemistry* 1997;8:621-636.
7. Thakur ML. *Nuclear Medicine Communications* 1995;16:724-732.
8. Liu S, Edwards DS. *Chemical Reviews* 1999;99:2235-2268.
9. Melendez-Alafort L, Ferro-Flores G, Arteaga-Murphy C, et al. *International Journal of Pharmaceutics* 1999;182:165-172.
10. De Rosch MA, Pearson DA, Cyr JE, et al. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 1999;217:188-NUCL.
11. Bardfeld PA, Chervu LR, Myrtry DRK. *British Journal of Radiology* 1976;49:381-382.
12. Lamberts SWJ, Koper JW, Reubi JC. *European Journal of Clinical Investigation* 1987;17:281-287.

13. Leimer M, Kurtaran A, SmithJones P, et al. *Journal of Nuclear Medicine* 1998;39:2090-2094.
14. Virgolini I, Szilvasi I, Kurtaran M, et al. *Journal of Nuclear Medicine* 1998;39:1928-1936.
15. Stolz B, Weckbecker G, SmithJones PM, Albert R, Raulf F, Bruns C. *European Journal of Nuclear Medicine* 1998;25:668-674.
16. Rosch F, Herzog H, Stolz B, et al. *European Journal of Nuclear Medicine* 1999;26:358-366.
17. Decristoforo C, Mather SJ. *Bioconjugate Chemistry* 1999;10:431-438.
18. Decristoforo C, Mather SJ. *Nuclear Medicine and Biology* 1999;26:389-396.
19. Decristoforo C, Mather SJ. *European Journal of Nuclear Medicine* 1999;26:869-876.
20. Erion JL, Bugaj JE, Schmidt MA, Wilhelm RR, Srinivasan A. *Journal of Nuclear Medicine* 1999;40:993.
21. Schally AV. *Cancer Research* 1988;48:6977-6985.
22. Kwekkeboom DJ, Krenning EP, Bakker WH, et al. *Journal of Nuclear Medicine* 1991;32:1845
23. 1848.
24. Bakker WH, Krenning EP, Breeman WA, et al. *Journal of Nuclear Medicine* 1990;31:1501-1509.
25. Kwekkeboom DJ, Kooij PP, Bakker WH, Macke HR, Krenning EP. *Journal of Nuclear Medicine*
26. 1999;40:762-767.
27. Decristoforo C, Melendez-Alafort L, Sosabowski JK, Mather SJ. *Journal of Nuclear Medicine*
28. 2000;41:1114-1119.
29. Decristoforo C, Mather SJ, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R. *European*
30. *Journal of Nuclear Medicine* 2000;27:1318-1325.
31. Decristoforo C, Cholewinski W, Donnemiller E, Riccabona G, Moncayo R, Mather SJ. *European*
32. *Journal of Nuclear Medicine* 2000;27:1580-1580.
33. Melendez-Alafort L, SJ. M. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 2001;Suppl. 1:S685-687.