

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**Desarrollo de una sonda molecular para inmunoPET  
dirigida a la metaloproteasa MT1- MMP con aplicación  
en oncología**

Memoria presentada por el licenciado en Biología:

*Ángel García de Lucas*

Para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Directores de tesis:

Dr. Miguel Ángel Morcillo Alonso

Dra. Marta Oteo Vives

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética en el Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)

Miguel Ángel Morcillo Alonso, doctor en Ciencias Biológicas, y Marta Oteo Vives, doctora en Ciencias Biológicas,

CERTIFICAN:

Que Ángel García de Lucas, Licenciado en Biología (especialidad Biología Molecular y Biotecnología) por la Universidad de Alcalá de Henares ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación correspondiente a su tesis doctoral con el título: **Desarrollo de una sonda molecular para inmunoPET dirigido a la metaloproteasa MT1- MMP con aplicación en oncología.**

Revisado este trabajo, los que suscriben consideran el trabajo realizado satisfactorio y autorizan su presentación para ser evaluado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a                    de                    de 2018.

Vº Bº directores

Miguel Ángel Morcillo Alonso

Marta Oteo Vives

«En la vida, no hay nada que temer,  
solo hay que comprender»

MARIA SALOMEA SKLODOWSKA-CURIE, (1867-1934)

«Nullius in verba»

ROYAL SOCIETY OF LONDON (1660-ACTUALIDAD)

---

A mis padres,  
a mi hermano David  
y a Eva

---

# AGRADECIMIENTOS

---

Escribir una tesis doctoral es toda una aventura. No solo por el esfuerzo académico que ello conlleva, sino también por todas las vicisitudes personales a las que uno se ve enfrentado. Esta empresa sería difícil, tal vez imposible llevarla a buen puerto, sin el apoyo de las múltiples personas que han colaborado conmigo. Al final, los doctorandos somos el motor en el que se canalizan los diferentes esfuerzos de la sociedad por avanzar hacia una humanidad más sabia a través de la realización de un proyecto de investigación. Como ya escribió Isaac Newton en una carta a Robert Hooke, en 1676: «Si he visto más lejos es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes». Estos gigantes, además de todos los científicos involucrados en el desarrollo de los conocimientos necesarios para escribir una tesis, los forman todas las personas e instituciones que nos inspiran, enseñan y apoyan a lo largo de la vida. Por todo ello, la culminación con éxito de un proyecto de investigación es una victoria de toda una sociedad.

A las primeras personas que quisiera dar las gracias es a mis directores de tesis por su guía, apoyo y paciencia durante estos años. Al Dr. Miguel Ángel Morcillo por todo lo que me ha enseñado a la hora de trabajar con radiactividad, farmacocinética y bioestadística. A la Dra. Marta Oteo por todo lo que me ha aportado sobre biología celular e inmunología.

Gracias a mis compañeros de la Unidad de Aplicaciones de Radioisótopos en Biomedicina del CIEMAT y al personal de la IR-08. Al Dr. Eduardo Romero por todo lo que me enseñó de radioquímica y radiofarmacia además de su apoyo personal y comprensión. A Alfonso Martínez por sus lecciones en química, protección radiológica y..., bueno, Egipto, astrofísica, acertijos, juegos de lógica y muchas cosas más... A las últimas incorporaciones al equipo, Natalia Magro y Marta Ibáñez, por todo lo que he aprendido junto a ellas y por su contagioso sentido del humor...; sois geniales, chicas. A los habitantes de la IR-08: Tomasi Sánchez, Vicente Jurado, Salvador Sánchez y al resto de personal de la instalación. A todos ellos, porque, además de excelentes profesionales, son unas estupendas personas.

También quisiera dar las gracias a todos los profesionales de otros centros que han colaborado activamente en el desarrollo de esta tesis. A la Dra. Francisca Mulero y a su equipo por todo lo que me han enseñado, por su apoyo y por hacerme sentir como en casa en la Unidad de Imagen Molecular del CNIO. Al Dr. Jorge L. Martínez-Torrecuadrada por aportar a este proyecto su conocimiento en el campo del diseño y la producción de anticuerpos, además de sus conocimientos en biología molecular. Al Dr. Alberto J. Schumacher por todo el conocimiento que nos ha aportado en el campo de la biología del glioblastoma y por su buena disposición. Al Dr. Mario Cañadas por darme un punto de vista diferente, desde la ingeniería, de la imagen molecular además de su paciencia y disposición.

A mis otros maestros: Juan S. Jiménez, María J. Benítez, José Antonio López-García, Iván Rivera-Arconada y David Vega-Avelaira, porque de todos ellos aprendí valiosas lecciones de la vida y de la ciencia que me han sido muy útiles durante estos años.

A mis padres, Pedro Ángel y María Soledad, y mi hermano David por su apoyo y cariño incondicionales. A mi ahora novia y futura mujer, Eva; sin tu cariño y paciencia no hubiera podido terminar este proyecto. A mi familia y en

especial a mi tío Carlos García por sus lecciones y a mi prima Beatriz Álvarez por el estupendo diseño de portada de la tesis. A mis amigos, en especial a Luis Miguel Herencia y a Juan Luis Madrigal por estar ahí todos estos años.

Por último, dar las gracias a todos y cada uno de los que altruistamente participaron donando dinero en el proyecto de «Detección y seguimiento del cáncer cerebral más común y dañino» en la plataforma de micromecenazgo Precipita (<https://www.precipita.es>) creada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT).

¡Gracias!

# RESUMEN

---

La inmuno-tomografía por emisión de positrones (inmunoPET) es una técnica de imagen no invasiva basada en la monitorización y cuantificación *in vivo* de anticuerpos monoclonales (mAb), fragmentos y péptidos de anticuerpos radiomarcados. La imagen de anticuerpos puede proporcionar un método sensible y no invasivo para la caracterización *in vivo* del fenotipo de la superficie celular, que a su vez podría ayudar a guiar el diagnóstico, pronóstico, selección de la terapia y monitorización del tratamiento del cáncer. Un gran número de estudios han demostrado la utilidad de la metaloproteasa de matriz de membrana MT1-MMP como una interesante diana para el diagnóstico a causa de su alta expresión en muchos tumores al igual que su importancia en invasión, angiogénesis y metástasis.

Un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra el dominio catalítico de MT1-MMP, denominado LEM 2/15, se conjugó con p-isotiocinabencil-deferoxamina (DFO-Bz-NCS) para marcarlo con  $^{89}\text{Zr}$ . Estudios de biodistribución *ex vivo* e imagen PET se realizaron en ratones xenograft portadores de células de glioblastoma (GBM) humanas y células de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC) humanas implantadas en los flancos, ambos tumores con uno de los peores pronósticos y tasas de supervivencia en pacientes. El radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 también se inyectó en modelos ortotópicos de GBM en cerebro con diferentes grados de disrupción en la barrera hematoencefálica y en modelos ortotópicos de PDAC derivados de pacientes (PDX), modelos más reales, con el fin de realizar estudios de imagen PET.

El rendimiento radioquímico, actividad específica y estabilidad del radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue óptimo para la realización de los estudios de inmunoPET; además, la conjugación y marcaje del anticuerpo no modificó sustancialmente la inmunoreactividad del anticuerpo intacto. Los experimentos de biodistribución *ex vivo* y los estudios de imagen molecular mediante PET indicaron que  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 tiene un excelente potencial como radiotrazador para la detección de MT1-MMP en tumores de GBM que sobreexpresan dicha metaloproteasa. Los resultados obtenidos en los modelos ortotópicos de GBM revelaron que el radiotrazador pudo acceder a la masa tumoral cuando la barrera hematoencefálica estuvo alterada. Los estudios realizados con un anticuerpo del mismo isotipo pero inespecífico ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG) en los modelos de GBM sugieren que una gran parte de la captación del radiotrazador en el tumor fue debida al efecto de permeabilidad y retención aumentada (efecto EPR) característico de los tumores. Los modelos PDX de PDAC mostraron una gran acumulación en la zona del páncreas y la biodistribución *ex vivo* arrojó resultados similares a al modelo GBM. El análisis inmunohistoquímico confirmó la especificidad del inmunoconjugado en todos los modelos animales. Finalmente, la inmunoPET demostró que es una técnica adecuada para realizar estudios farmacocinéticos.

# ABSTRACT

---

Immuno-positron emission tomography (ImmunoPET) is a non-invasive imaging technology based on the *in vivo* tracking and quantification of radiolabeled monoclonal antibodies (mAb), antibody fragments and peptides. Antibody imaging can provide a sensitive, noninvasive means for molecular characterization of cell surface phenotype *in vivo*, which can in turn guide diagnosis, prognosis, therapy selection, and monitoring of cancer treatments. A large number of papers have proved the Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), a proteinase overexpressed in *many* aggressive tumours and associated with enhanced cell proliferation, migration, *angiogenesis*, *metastasis*, as an interesting target for the development of both diagnostic and therapeutic approaches.

An anti-human MT1-MMP monoclonal antibody, LEM 2/15 was conjugated to p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine (DFO-Bz-NCS) for  $^{89}\text{Zr}$  labeling. Biodistribution and PET imaging studies were performed in xenograft mice bearing human glioblastoma (GBM) cells and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells, both tumors among those with the worst prognostic and survival rates. The radiotracer  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 was injected in orthotopic GBM brain models with different degrees of blood-brain barrier disruption as well as orthotopic PDAC patient-derived xenograft (PDX) models, which are more closely resemble human cancer features, in order to perform PET imaging studies.

The radiotracer  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 was prepared in high radiochemical yield and specific activity and exhibited excellent *in vivo* stability to perform immunoPET studies; moreover, the immunoreactivity of the radiotracer was equal to that of the original antibody. Biodistribution *ex vivo* experiments and molecular imaging PET studies indicated a remarkable potential of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 as a radiotracer for detection of MT1-MMP positive GBM tumors. Studies using orthotopic brain GBM models revealed a high dependence on a disrupted blood-brain barrier for tracer penetration into tumors. However, the comparative between  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 and  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-nonspecific IgG in GBM models demonstrated an accumulation within tumors due to the enhanced permeability and retention effect (EPR effect). The PDAC PDX models showed much higher accumulation in pancreas area and *ex vivo* biodistribution yielded similar results compared to the GBM model. Histological analysis confirmed the specificity of the immunoconjugate in all animal models. Finally, immunoPET showed that it was an adequate technique for pharmacokinetic studies.



# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTADO DE ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS</b>	<b>XIX</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
1. Contextualización	23
2. La herramienta: inmunoPET	25
2.1. Tomografía por emisión de positrones/tomografía axial computarizada (PET/CT)	26
2.2. Anticuerpos	28
2.3. Radioquímica I: radioisótopos	30
2.4. Radioquímica II: quelantes del <sup>89</sup> Zr	32
3. La diana: MT1-MMP	33
3.1. Estructura y función	33
3.2. El papel de la MT1-MMP en el cáncer	35
3.3. Anticuerpos dirigidos a MT1-MMP	37
4. Diagnóstico por imagen de tumores cerebrales y cáncer de páncreas	38
4.1. Glioblastoma multiforme	38
4.2. Adenocarcinoma ductal pancreático	41
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>45</b>
1. Anticuerpos	45
1.1. LEM2/15	45
1.2. IgG inespecífica	45
2. Líneas celulares	45
2.1. Glioblastoma multiforme	45
2.2. Adenocarcinoma pancreático ductal	46

2.3. Otras líneas celulares	46
3. Evaluación de la expresión de MT1-MMP en las líneas celulares	46
3.1. Western blot	46
3.2. Citometría de flujo	46
4. Radioquímica	47
4.1. Conjugación con DFO	47
4.2. Marcaje con <sup>89</sup> Zr	48
4.3. Caracterización del anticuerpo (control de calidad)	48
4.3.1. Número de quelantes por anticuerpo	48
4.3.2. Pureza radioquímica	48
4.3.3. Estabilidad <i>in vitro</i>	49
4.3.4. Inmunoreactividad	49
5. Modelos tumorales subcutáneos y ortotópicos en roedores	50
5.1. Glioblastoma multiforme	50
5.2. Adenocarcinoma pancreático ductal	51
6. Estudios de biodistribución <i>ex vivo</i> y microPET/CT	52
6.1. Grupos experimentales	52
6.2. Análisis de radiactividad mediante contador gamma	54
6.3. Equipo microPET/CT	54
6.3.1. Adquisición de imagen	57
6.3.2. Reconstrucción y análisis de imagen	57
6.4. Análisis farmacocinético	59
7. Integridad de la barrera hematoencefálica en el modelo de GBM	60
8. Autorradiografía e inmunohistoquímica	60
8.1. Autorradiografía	60
8.2. Inmunohistoquímica	61
9. Análisis estadístico	61
<b>RESULTADOS</b>	<b>63</b>
1. Expresión de MT1-MMP en líneas celulares	63
2. Radioquímica	64
2.1. <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15	64
2.2. <sup>89</sup> Zr-DFO-IgG inespecífica	66
3. Modelos animales xenografts heterotópicos subcutáneos de glioblastoma	67

---

3.1. Modelos animales de U251 y MCF7 (grupo 1)	67
3.1.1. Estudios de biodistribución <i>ex vivo</i> e imagen microPET de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15	67
3.1.2. Farmacocinética	71
3.1.3. Inmunohistoquímica	71
3.2. Modelos animales de U251 (grupo 2)	72
3.2.1. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15 vs. <sup>89</sup> Zr-DFO-IgG inespecífica	72
3.2.2. Farmacocinética	73
3.2.3. Inmunohistoquímica y autorradiografía	74
3.3. Modelos animales de TS543 (grupo 3)	74
3.3.1. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15 vs. <sup>89</sup> Zr-DFO-IgG inespecífica	74
<b>4. Modelos animales ortotópicos de glioblastoma</b>	<b>75</b>
4.1. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15 vs. <sup>89</sup> Zr-DFO-IgG inespecífica en modelos animales de U251 (grupo 4)	75
4.2. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15 vs. <sup>89</sup> Zr-DFO-IgG inespecífica en modelos animales de TS543 (grupo 5)	77
4.3. Tinción de Evans	78
4.4. Inmunohistoquímica y autorradiografía	78
<b>5. Modelo animal xenograft heterotópico subcutáneo de adenocarcinoma ductal pancreático</b>	<b>79</b>
5.1. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15 en modelos animales de CAPAN-2 (grupo 6)	79
5.2. Farmacocinética	81
5.3. Inmunohistoquímica	81
<b>6. Modelos animales ortotópicos de adenocarcinoma ductal pancreático</b>	<b>82</b>
6.1. Selección del xenoinjerto de PDAC	82
6.2. Modelo derivado del tumor de un paciente (grupo 7)	83
6.2.1. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15	83
6.2.2. Farmacocinética	85
6.2.3. Inmunohistoquímica	86
6.3. Modelo metastásico (grupo 8)	87
6.3.1. Imagen microPET/CT de <sup>89</sup> Zr-DFO-LEM 2/15	87
6.3.2. Inmunohistoquímica	87
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<hr/>	
1. Radioquímica	90
2. Estudios en modelos animales xenografts heterotópicos subcutáneos de glioblastoma multiforme	90

3. Estudios en modelos animales ortotópicos de glioblastoma multiforme	92
4. Estudios en modelos animales de adenocarcinoma ductal pancreático	93
5. Farmacocinética	95
6. Limitaciones y perspectivas	96

---

<b>CONCLUSIONES</b>	<b>99</b>
---------------------	-----------

---

<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>
---------------------	------------

---

<b>ANEXOS</b>	<b>123</b>
---------------	------------

---

Anexo 1. Publicaciones y congresos	123
Anexo 2. Targeting MT1-MMP as an ImmunoPET-Based Strategy for Imaging Gliomas	125
Anexo 3. Figuras de material complementario	144
Índice de tablas	147
Índice de figuras	149

# LISTADO DE ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

A	Número másico
ADAM	desintegrina y metaloproteínasa
ADAM-9	desintegrina y metaloproteínasa-9
ARG	Autoradiografía
ATCC	American Type Culture Collection
ATSM	Diacetil-bis (N 4-metil tiosemicarbazona)
AUC	Área bajo la curva
BCR	Receptor antigénico de los linfocitos B
BGO	Germanato de bismuto
BSA	Albumina de suero bovino
CD20	Antígeno CD20
CD31	Molécula de citoadhesión endotelial plaquetaria PECAM-1
CD44	Antígeno CD44
CD46v6	Antígeno CD46v6
CD52	Antígeno CAMPATH-1
CD146	Molécula de adherencia celular del melanoma
CD147	Inductor de metaloproteasa de matriz extracelular
CDR	Regiones determinantes de la complementariedad
CEIyBA	Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal
$C_H$	Dominio constante de la cadena pesada
CIEMAT	Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
CIOMS	Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas
$C_L$	Dominio constante de la cadena ligera
Clp	Aclaramiento plasmático
CmAb	Anticuerpo monoclonal quimérico
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CNIO	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
$Cpm_m$	Cuentas por minuto
Cps	Cuentas por segundo
CsI	Yoduro de cesio
CT	Tomografía axial computarizada
CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
Cyr61	Inductor angiogénico 61 rico en cisteína
DAB	diaminobencidina
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida
DFO	Deferoxamina
DFO-Bac	Bromoacetamido-deferoxamina
DFO-Bz-NCS	p-isotiocianatobencil-deferoxamina

DFO-Chx-Mal	maleidociclohexil-deferoxamina
DFO-lac	Iodoacetamino-deferoxamina
DIPG	Glioma pontino intrínseco difuso
DJ-1	Proteína del Parkinson 7
DII1	Delta-like protein 1
DMEM	medio de cultivo Eagle modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOTATOC	ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético-Tyr3-octreótido
dpm <sub>p</sub>	Desintegraciones por minuto
DR6	Receptor de muerte 6
DTPA	ácido dietilentriaminopentaacético
e+	Positrón
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio-mesenquimal
EPR	Efecto de permeabilización y retención aumentada
Fab	Fragmento de unión al antígeno
F(ab') <sub>2</sub>	Dos fragmentos Fab unidos por el puente disulfuro intercatenario
FAZA	Fluoroazomicina arabinósido
FBP	Algoritmo de retroproyección filtrada
FBS	Suero bovino fetal
Fc	Fragmento cristizable
FcRn	Receptor Fc neonatal
FcγR	Receptor Fc
FDG	Fluorodesoxiglucosa
FET	Fluoroetil-tirosina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FLT	Fluorotimidina
FMISO	Fluoromisonidazol
FORE	Fourier Rebinning
FOV	Campo de visión
GBM	Glioblastoma multiforme
GFP	Proteína verde fluorescente
GLUT	Transportadores de glucosa
GSO	Ortosilicato de Gadolinio
GSO:Ce	Ortosilicato de Gadolinio activado con Cerio
HAT	Medio selectivo compuesto por hipoxantina-aminopterina-timidina
H&E	Tinción hematoxilina-eosina
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HOPO	Derivado de hidroxipiridinonas
HRP	Enzima peroxidasa de rábano
Hsp90alpha	Proteína de shock térmico de 90 kDa

HU	Unidades Hounsfield
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelulares
IgG	Inmunoglobulina G
IHC	Inmunohistoquímica
ISCIII	Instituto de Salud Carlos III
ITLC	Cromatografía en capa fina instantánea
Kel	Constante de eliminación
Ki67	Marcador de proliferación Ki67
KiSS-1	Kisspeptina-1
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LSO	Ortosilicato de lutecio
LYSO	Cristales de centelleo de Lutecio-Itrio -Silicato
LYSO:Ce	Cristales de centelleo de Lutecio-Itrio -Silicato activados con Cerio
LogK	Constante de estabilidad termodinámica
LOR	Línea de respuesta
mAb	Anticuerpo monoclonal
MET	Metionina
MLEM	Método de estimación de máxima verosimilitud
MMP	Metaloproteasa o metaloproteinasa
MMP-2	Metaloproteasa-2
MMP-9	Metaloproteasa-9
MMP-14	Metaloproteasa-14 o metaloproteasas de membrana tipo 1
MRI	Imagen por resonancia magnética
MRT	Tiempo medio de residencia
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MT-MMP	Metaloproteasas de membrana
MT1-MMP	Metaloproteasa-14 o metaloproteasas de membrana tipo 1
MT3-MMP	Metaloproteasa-16 o metaloproteasas de membrana tipo 3
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
NaI(Tl)	Yoduro de sodio activado con talio
NGS	Ratones NOD Scid Gamma
NSC	Medio Basal NeuroCult™ NS-A
N-suc-DFO	Deferoxamina-succinil-N-TFP
OI	Imagen Óptica
OSEM	Método de subconjuntos ordenados
PBS	Tampon fosfato salino
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático
PDX	Xenoinjertos derivados de paciente
PET	Tomografía por emisión de positrones
PFA	Paraformaldehído
PM	Peso molecular
PMT	Tubo fotomultiplicador
pro-MMP-2	Proenzima metaloproteasa-2
pro-MMP-13	Proenzima metaloproteasa-13

r	Radio
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
Rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute
ROI	Región de interés
scFv	Anticuerpo de cadena sencilla
SD	Desviación típica
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SF	Factor de calibración
SLP1	Proteína similar a SUN
SPECT	Tomografía por emisión de fotón único
SUV	Valor de la captación estandar
t <sub>½</sub>	Semivida de eliminación
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteasas
TIMP-2	Inhibidor tisulares de metaloproteasas-2
TK	gen timidina quinasa
TMZ	Temozolomida
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
tTG	Transglutaminasa tisular
US	Ultrasonidos
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
V <sub>H</sub>	Dominio variable de cadena pesada
V <sub>L</sub>	Dominio variable de cadena ligera
VOI	Volumen de interés
Vss	Volumen de distribución en el estado estacionario
X	Núcleo inicial
Y	Núcleo resultante
Z	Número atómico
% ID	Porcentaje de la dosis inyectada
% ID/g	Porcentaje de la dosis inyectada/gramo
% ID/ml	Porcentaje de la dosis inyectada/mililitro
β <sup>+</sup>	Decaimiento beta positivo
ν	Neutrino
θ	Ángulo
ε	Captura electrónica
3Rs	Principio de las 3 Rs (reemplazo, reducción y refinamiento)



# INTRODUCCIÓN

---


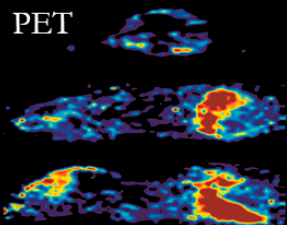
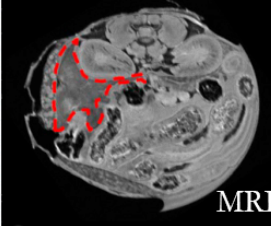
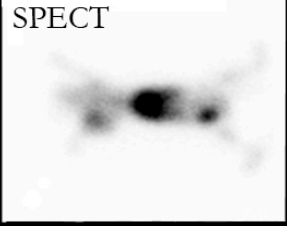
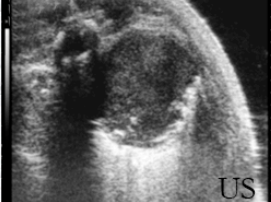

## 1. Contextualización

La imagen biomédica se podría definir como la ciencia y rama de la medicina interesada en el desarrollo y uso de aparatos y técnicas para obtener imágenes de la anatomía interna y en proveer un análisis bioquímico y fisiológico de tejidos y órganos<sup>1</sup>. Gracias al desarrollo de esta disciplina podemos monitorizar todo el espectro de una enfermedad: el comienzo, la progresión y evaluar el tratamiento. En los orígenes de este campo científico, enfocado sobre todo en la salud humana, los equipos clínicos también se utilizaban para obtener y estudiar imágenes de animales pequeños. Estas imágenes eran de baja resolución y sensibilidad, pero demostraron la valiosa información que se podía obtener con estas técnicas en la investigación preclínica<sup>2</sup>. Así, el siguiente paso fue desarrollar la tecnología adecuada para estudiar animales pequeños, como la rata o el ratón, apareciendo dentro de la imagen biomédica una subdisciplina conocida como imagen preclínica.

La investigación animal ha sido un componente integral de la investigación biomédica durante los últimos 100 años, pero ha estado limitada a los estudios *in vitro* de procesos celulares y al análisis de los tejidos *ex vivo* derivados de modelos animales de enfermedad. En los pasados 30 años, y particularmente en la última década, las mejoras dentro del campo de la imagen preclínica han hecho que estas técnicas puedan complementar los métodos habituales de investigación con animales de experimentación<sup>3</sup>. Además, la mayoría de las técnicas de imagen preclínicas son las mismas que se utilizan en clínica, haciendo fácilmente trasladables los resultados a humanos<sup>2</sup>. Los dispositivos de imagen, desde la perspectiva de las 3Rs (reemplazo, reducción y refinamiento), se han valorado como técnicas de refinamiento porque son menos invasivas que las clásicas; además, también ayudan en la disminución del número de animales y a la reducción de la variabilidad biológica interindividual en cada experimento<sup>2,3</sup>. Estas herramientas han demostrado ser muy útiles en la validación preclínica de fármacos dirigidos a dianas específicas y pueden ayudarnos al estudio de interacciones complejas entre procesos fisiológicos, que no pueden ser evaluadas *in vitro* o *ex vivo*<sup>2,4</sup>. Actualmente, la imagen preclínica está siendo muy utilizada en investigación por las áreas de oncología, cardiología y en las neurociencias.

Dentro de la imagen biomédica, y en la preclínica en particular, podemos encontrar dos grandes grupos de técnicas (figura 1): las de imagen estructural y las de imagen funcional y molecular. En general, las técnicas de imagen estructural tales como la tomografía axial computarizada (CT), la imagen por resonancia magnética (MRI) y los ultrasonidos (US) se caracterizan porque permiten obtener información anatómica e imágenes de alta resolución; sin embargo, ninguna de ellas es capaz de detectar una patología hasta que el tejido no ha sufrido importantes cambios estructurales como el crecimiento de un tumor. Por otro lado, las técnicas de imagen funcional y molecular dan información sobre la actividad fisiológica del tejido u organismo pudiendo detectar cambios a nivel celular y molecular (tales como cambios en el metabolismo, flujo regional de sangre o composición química de una región). Estas últimas las podemos clasificar en técnicas de imagen nuclear (gammagrafía, tomografía por emisión de fotón único (SPECT) y tomografía por emisión de positrones (PET)) y de imagen óptica (OI, tales como la bioluminiscencia, fluorescencia e imagen de fluorescencia del infrarrojo cercano). En comparación con las técnicas estructurales, estas tienen una resolución espacial menor. Cada modalidad de imagen tiene sus ventajas e

inconvenientes, por lo que la selección de una o una combinación de ellas dependerá del problema biológico que se quiera estudiar<sup>4</sup>. En general, las diversas técnicas son complementarias ya que el uso de varias para un mismo fin incrementa la cantidad y calidad de la información. Por ello, la tendencia actual es a realizar estudios con varias técnicas de imagen gracias al desarrollo de equipos multimodales o híbridos<sup>5</sup>.

Técnicas de imagen estructural		Técnicas de imagen funcional	
 CT	<b>Ventajas</b> Alta resolución espacial Translación clínica <b>Desventajas</b> Imagen no específica Radiación Poco contraste en tejido blando	<b>Ventajas</b> Alta sensibilidad con penetración ilimitada en los tejidos Translación clínica <b>Desventajas</b> Coste	 PET
 MRI	<b>Ventajas</b> Alta resolución y contraste con tejido blando Translación clínica <b>Desventajas</b> Coste Tiempo de imagen	<b>Ventajas</b> Ilimitada penetración en tejidos Translación clínica <b>Desventajas</b> Resolución espacial limitada	 SPECT
 US	<b>Ventajas</b> Alta resolución espacial y temporal Bajo coste Translación clínica <b>Desventajas</b> Dependencia de operador Imagen dirigida limitada al compartimento vascular	<b>Ventajas</b> Cribado de alto rendimiento para confirmación de diana y optimización de compuestos Alta sensibilidad <b>Desventajas</b> Translación clínica limitada Baja penetración de tejido	 OI

**Figura 1.** Ventajas y desventajas de las principales modalidades de imagen preclínica. De arriba abajo y de izquierda a derecha: tomografía axial computarizada del esqueleto de un ratón (CT), imagen por resonancia magnética de un corte axial de ratón perfundido con paraformaldehído a la altura del páncreas extraído de José L. Paredes *et al.* (2014) (MRI), imagen por ultrasonido o ecografía del tumor pulmonar de un ratón extraído de Florian Raes *et al.* (2016) (US), imagen de un anticuerpo radiomarcado en un tumor cerebral en un ratón (PET), imagen de un péptido radiomarcado en un modelo tumoral en ratón extraído de Qian Zhao (2013) (SPECT), e imagen de células tumorales en ratón por fluorescencia en un IVIS (OI).

Las técnicas de imagen molecular que mayor interés despertaron son las nucleares debido a que presentan una mayor penetración en los tejidos que las de imagen óptica, pudiendo trasladarlas con facilidad al ámbito clínico (medicina nuclear). Su fundamento consiste en la administración a un sujeto de cantidades traza de un compuesto de interés biológico marcado con un radioisótopo para visualizar algún proceso biológico o patológico. Dentro de la medicina nuclear, la PET es, actualmente, la técnica que mejor resolución, sensibilidad y calidad de imagen consigue. Además, también es una de las técnicas que más relevancia está cogiendo dentro del campo de la imagen preclínica<sup>6</sup>. Los equipos PET de imagen preclínica son conocidos como microPET. La principal diferencia con los equipos clínicos es una mejora en la resolución; mientras que en los primeros ronda los 5 mm, en los microPET está cerca de 1 mm<sup>7</sup>. Esta técnica es muy sensible y cuantitativa, pudiendo detectar un radiotrazador en una región de un organismo en cantidades del orden de los picomoles<sup>8</sup>. Un importante avance en el desarrollo de la PET han sido los equipos multimodales, como la PET/CT, que permite una corrección de la atenuación exacta y una localización anatómica más precisa de las zonas con mayor captación de radiotrazador<sup>9</sup>. Otro tipo de equipo multimodal es la PET/MRI, una tecnología emergente, que podría conseguir imágenes con un mejor contraste entre los diferentes tejidos blandos y realizar estudios en los cuales el paciente reciba una menor dosis por radiación<sup>10</sup>.

La oncología ha sido uno de los principales campos en beneficiarse del desarrollo de la tecnología y de los radiofármacos PET, fundamentalmente por la  $^{18}\text{F}$ -fluorodesoxiglucosa ( $^{18}\text{F}$ -FDG), un análogo de la glucosa que se utiliza para evaluar la actividad metabólica en un determinado tejido. Este radiofármaco es utilizado aproximadamente en el 90 % de la práctica clínica y se considera el método de referencia diagnóstico en medicina nuclear<sup>11</sup>. La  $^{18}\text{F}$ -FDG es usada en la valoración de diferentes neoplasmas, tanto antes como después del tratamiento; también se usa para la planificación de la radioterapia en varios tipos de tumores, como el cáncer de pulmón y de cabeza y cuello. Asimismo, es de gran utilidad en el reestadiaje y la monitorización del tratamiento del cáncer después de la terapia<sup>12</sup>. El amplio uso de este radiotrazador es debido a que la mayoría de tumores tienen una elevada captación de glucosa en comparación con los órganos y tejidos normales (efecto Warburg)<sup>13</sup>. Sin embargo, hay algunas excepciones a esta regla como el carcinoma renal, el cual no muestra una alta acumulación de glucosa, o el cáncer de próstata, cuya captación de  $^{18}\text{F}$ -FDG es variable e impredecible<sup>14-17</sup>. La elevada captación de glucosa en la mayoría de los tumores, así como en determinados tejidos (miocardio, cerebro, etc.), se debe a la sobreexpresión de las proteínas transmembrana de transporte de glucosa (GLUT) en la superficie celular y al incremento de los niveles de hexoquinasa intracelular<sup>18</sup>. No obstante, aunque la  $^{18}\text{F}$ -FDG es un buen radiotrazador para la localización de tumores, no es específico de estos. Existen otros procesos asociados a las células que tienen una alta captación de glucosa como la inflamación, la infección y la hiperplasia de médula ósea o timo. Asimismo, la aparición de cambios inflamatorios después de la cirugía o irradiación y otros procesos derivados del tratamiento hacen que la  $^{18}\text{F}$ -FDG no sea el mejor radiofármaco para la valoración postratamiento en oncología. Los falsos positivos también pueden venir de procesos fisiológicos como el metabolismo de la grasa parda y la actividad ginecológica colónica o cíclica. La diferenciación de estos del tumor residual o recurrente puede ser complicada porque a menudo los patrones de captación e intensidad son similares<sup>12</sup>. Además de la  $^{18}\text{F}$ -FDG, otros radiotrazadores están disponibles para la evaluación de otros procesos fisiológicos del cáncer como por ejemplo el metabolismo de aminoácidos ( $^{11}\text{C}$ -Metionina ( $^{11}\text{C}$ -MET)), la proliferación de tumores ( $^{18}\text{F}$ -Fluorotimidina ( $^{18}\text{F}$ -FLT)), la hipoxia tumoral ( $^{18}\text{F}$ -Fluoromisonidazol ( $^{18}\text{F}$ -FMISO),  $^{18}\text{F}$ -Fluorazomicina arabinósido ( $^{18}\text{F}$ -FAZA) o  $^{62}\text{Cu}$ -diacetil-bis(N4-metil-tiosemicarbazona) ( $^{62}\text{Cu}$ -ATSM)), la apoptosis de células tumorales ( $^{18}\text{F}$ -Anexina V), la angiogénesis tumoral ( $^{18}\text{F}$ -péptidos RGD) y la unión a receptores que se sobreexpresan en tumores ( $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC)<sup>11</sup>. Dentro de este panorama, es importante identificar nuevos marcadores biológicos para desarrollar radiofármacos específicos y, así, obtener información útil de la biología del cáncer para ayudar a mejorar tanto el diagnóstico como la elección y monitorización del tratamiento.

## 2. La herramienta: inmunoPET

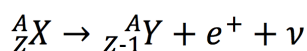
El uso de anticuerpos como agentes de imagen en medicina nuclear ha recobrado interés, durante la primera década del siglo XXI, gracias a la mejora de la instrumentación en imagen y a la mayor accesibilidad a los radionúclidos<sup>19</sup>. Este enfoque es conocido como inmunoPET y se podría definir como una técnica de imagen no invasiva basada en la monitorización y cuantificación *in vivo* por PET de anticuerpos, fragmentos y péptidos de anticuerpo marcados con radionúclidos emisores de positrones<sup>20</sup>. La capacidad de los anticuerpos de unirse a dianas específicas con una afinidad del orden de nano a picomolar proporciona una buena base para el desarrollo de agentes de imagen altamente sensibles. Además, debido a su gran tamaño pueden ser útiles en el transporte de otras moléculas, de aplicación en imagen o terapia, sin modificar sus propiedades<sup>21</sup>. A pesar de ser una herramienta novedosa dentro del campo de la imagen molecular y la medicina nuclear, el gran éxito que han tenido los anticuerpos marcados con el radionúclido  $^{89}\text{Zr}$  en imagen preclínica ha originado su rápido traslado al ámbito clínico<sup>22</sup>. Las potenciales

aplicaciones de la inmunoPET son el diagnóstico y estadificación de una enfermedad, la estratificación de los pacientes, la monitorización de la respuesta a la terapia y la planificación de la radioinmunoterapia<sup>23</sup>.

El primer estudio que empleó esta aproximación en la clínica fue publicado en 2006 por Börjesson *et al.* En este trabajo se investigaba el valor diagnóstico del anticuerpo monoclonal quimérico (cmAb) U36 marcado con <sup>89</sup>Zr en la detección de tumores de cabeza y cuello positivos para CD44v6. Se comprobó que el radiotrazador era seguro y capaz de detectar todos los tumores primarios. Además, la inmunoPET tuvo una sensibilidad del 72 % en la detección de las metástasis en los nódulos linfáticos, mientras que en la CT o MRI fue del 60 %<sup>24</sup>. Posteriormente, este mismo grupo amplió el estudio de <sup>89</sup>Zr-cmAb U36 con otro trabajo sobre la dosimetría y la cuantificación en pacientes<sup>25</sup>. Este éxito junto con los recientes trabajos de Lars Perk y Maria Vosjan *et al.* en el desarrollo de métodos de radiomarcaje para <sup>89</sup>Zr, más rápidos y sencillos que los anteriormente establecidos, han disparado la investigación en inmunoPET durante los últimos años<sup>26,27</sup>.

## 2.1. Tomografía por emisión de positrones/tomografía axial computarizada (PET/CT)

El escáner PET o microPET permite localizar la distribución de una molécula marcada con un isótopo emisor de positrones administrada a un sujeto. El fenómeno físico por el que se emiten los positrones se conoce como decaimiento  $\beta^+$  y se caracteriza porque un núcleo atómico inestable se desintegra perdiendo un protón y generándose un neutrón, un positrón ( $e^+$ ) y un neutrino ( $\nu$ )<sup>28</sup>. Al desintegrarse, se transforma en un elemento químico diferente al inicial. Este proceso se describe con el siguiente esquema:



donde X es el núcleo inicial, Y el núcleo resultante, A el número másico y Z el número atómico.

Los positrones viajan una pequeña distancia perdiendo energía cinética hasta que se aniquilan con los electrones presentes en el medio. La aniquilación se debe a que los positrones son la antimateria del electrón, esto significa que tienen la misma masa que el electrón, pero carga positiva. La distancia entre la emisión y la aniquilación es conocida como el rango del positrón y depende de la energía inicial de este. Como consecuencia de la aniquilación se forman dos fotones gamma de 511 KeV (fotones de aniquilación) emitidos con un ángulo aproximado de unos 180° que serán detectados en coincidencia por dos detectores opuestos. Estos detectores están formados por cristales de centelleo (NaI(Tl), BGO, LSO o LYSO), unidos a un tubo fotomultiplicador, y se disponen en un anillo alrededor de donde se situará el sujeto de investigación dentro del equipo PET. Los materiales centelladores transforman la energía de un fotón gamma incidente en luz visible, que es proporcional a la energía depositada por el fotón. Cada par de detectores opuestos al interactuar con los fotones define una línea de respuesta (LOR) en la que se encuentra el punto donde se produjo la aniquilación; este proceso se conoce como colimación electrónica. El almacenamiento de las LOR se realiza en función de sus coordenadas polares, esto es, un radio y un ángulo ( $r, \theta$ ). A esta forma de guardar y representar las LOR se la conoce como sinograma y se utiliza como datos de entrada (*input*) de los algoritmos de reconstrucción para generar la imagen PET final<sup>28,29</sup>.

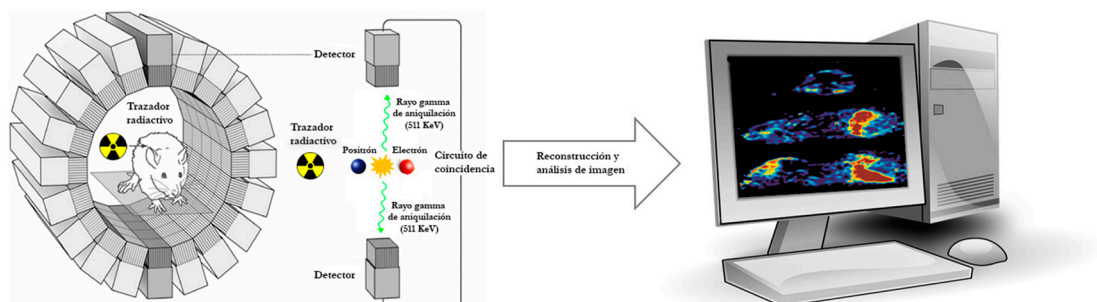
Los algoritmos de reconstrucción se pueden clasificar en analíticos y estadísticos. Los analíticos miden la distribución del radiotrazador de una manera simplificada y no utilizan información del sistema, aparte de la geometría utilizada

en la construcción del sinograma. La retroproyección filtrada (FBP) ha sido el más utilizado dentro de este grupo. Por otro lado, los algoritmos estadísticos o iterativos son una aproximación estadística con un coste computacional más alto, pero, en general, un mejor contraste y relación señal-ruido. El algoritmo iterativo más comúnmente utilizado era el método de la estimación de máxima verosimilitud (MLEM) hasta la llegada de algoritmos más rápidos como el método de subconjuntos ordenados (OSEM)<sup>28,29</sup>.

Una de las principales ventajas de la técnica PET es su capacidad de obtener medidas cuantitativas sobre las imágenes adquiridas; para que esto sea posible, y también para reconstruir las imágenes libres de artefactos, hay que tener en cuenta varias correcciones con las que cuentan los escáneres modernos como el tiempo muerto, la normalización, la atenuación, las coincidencias accidentales (*randoms*), las coincidencias dispersas (*scatter*) o el decaimiento<sup>28</sup>. Una vez aplicadas las correcciones pertinentes y reconstruida la imagen, la última fase de un estudio PET sería el análisis visual de la imagen, la segmentación y la cuantificación. Con la interpretación visual y cualitativa de las imágenes se puede localizar el trazador en la lesión maligna o tumor. Además, calibrando el equipo con una fuente de radiactividad, para el radioisótopo utilizado, se obtiene un factor de calibración que convierte los valores de la imagen en unidades de concentración radiactiva. Gracias a esto, se puede extraer parámetros cuantitativos que informan sobre la concentración de los radiotrazadores en el área de interés.

Esquemáticamente, el flujo de trabajo con un escáner microPET sería el siguiente (figura 2):

1. Administración de un radiotrazador, es decir, una molécula biológicamente activa que lleva un isótopo emisor de positrones el cual se inyecta al animal.
2. Acumulación del trazador en el área afín. Durante un tiempo el radionúclido se acumula en el área del cuerpo donde se encuentra la diana de la molécula biológicamente activa.
3. Desintegración del radioisótopo y aniquilación del positrón.
4. Detección de los fotones gamma de aniquilación por el escáner PET.
5. Coincidencia, selección y almacenamiento de los datos.
6. Reconstrucción de imágenes a través de algoritmos (FBP, MLEM, OSEM, etc.).
7. Análisis de la imagen. Estudio cualitativo y cuantitativo de la distribución del radiotrazador en el organismo.



**Figura 2.** Esquema del flujo de trabajo en un estudio PET. Modificado de Gabriela Kramer-Marek y Jacek Capala (2012).

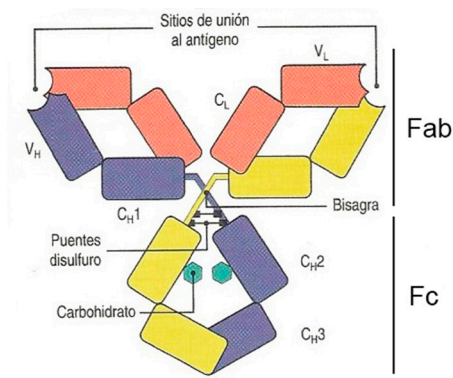
La fusión de la CT a la PET aporta una imagen anatómica de gran resolución que ayuda a localizar con precisión las lesiones tumorales. La CT está basada en la emisión de un haz colimado de rayos X sobre el sujeto estudiado. Los diferentes tejidos del organismo de estudio atenúan los rayos X haciendo que estos lleguen con diferente energía a un detector. Los coeficientes de atenuación de rayos X que se usan para representar la anatomía interna se expresan en unidades Hounsfield (HU)<sup>30</sup>.

Aunque este tipo de equipos se desarrollaron inicialmente para las aplicaciones clínicas, la miniaturización de los diferentes componentes ha hecho que actualmente haya una amplia oferta comercial en el campo de la imagen preclínica. Estos escáneres son útiles para investigar nuevos radiotrazadores y posteriormente trasladarlos al campo de la medicina nuclear.

## 2.2. Anticuerpos

La principal sonda molecular utilizada en inmunoPET son los anticuerpos monoclonales (mAb). Estas moléculas son producidas por un único clon de linfocito B y son la forma secretada del receptor B (B-cell receptor o BCR)<sup>31</sup>. Dentro de los diferentes isotipos de anticuerpos, el predominante en humanos es la inmunoglobulina G (IgG), siendo una de las proteínas más abundantes del suero humano. Los anticuerpos IgG se dividen en cuatro subclases (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) numeradas según su orden descendente de abundancia. La IgG1 se considera como el isotipo de anticuerpo más prometedor para la inmunoterapia contra el cáncer, además de demostrar buenas características para su uso en biotecnología<sup>32</sup>.

La estructura de una IgG (~150 kDa) está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras idénticas (25 kDa cada una) y dos cadenas pesadas idénticas (50 kDa cada una). La cadena ligera contiene un dominio variable ( $V_L$ ) y un dominio constante ( $C_L$ ). La cadena pesada está compuesta por un dominio variable ( $V_H$ ) y por tres dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Cada uno de estos dominios estructurales o dominio Ig está formado por, aproximadamente, 110 aminoácidos que forman dos láminas beta. Tanto las cadenas pesadas entre sí como las cadenas ligeras a las pesadas están unidas a través de puentes disulfuro. Los dominios  $V_H$  y  $V_L$  varían mucho entre anticuerpos y es en estas regiones donde se determina la especificidad de unión al antígeno a través de tres segmentos hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La yuxtaposición de  $V_H$  y  $V_L$  forma el sitio de unión al antígeno, existiendo dos por IgG. Según si los residuos a los que se une el anticuerpo se encuentran o no en línea dentro de la estructura primaria de la proteína diana, se distinguen dos tipos de epítomos: conformacionales o lineales, siendo los conformacionales los más comunes. Las IgG poseen una estructura flexible especialmente en la región bisagra y en la unión entre los dominios  $C_{H1}$ - $C_{H2}$  y  $V_H$ - $C_{H1}$  que permite un acoplamiento espacial adaptable<sup>31,33</sup>. Asimismo, son moléculas bifuncionales en las que la cadena ligera asociada con los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$  forman el fragmento de unión al antígeno (Fab), mientras que desde la región inferior de la bisagra y los dominios  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$  forman el fragmento cristalizante (Fc)<sup>34</sup>. Por último, las IgG contienen un carbohidrato en la posición N297 de las cadenas pesadas que ayuda a estabilizar la estructura proteica de la región Fc y les da una conformación más abierta permitiendo su unión al receptor Fc-gamma ( $Fc\gamma R$ )<sup>35</sup>. La figura 3 representa la estructura de un anticuerpo aquí descrita.



**Figura 3.** Representación esquemática de un anticuerpo IgG. Ilustra la composición de cuatro cadenas y los dominios separados que comprende cada una. Extraído de Janeway Ch A *et al.* (2003).

Desde un punto de vista farmacocinético, los anticuerpos del isotipo IgG, debido a su tamaño (10 nm), tienen un aclaramiento plasmático (Clp) lento, una semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) larga y una distribución en los tejidos limitada. Después de una inyección intravenosa suelen presentar un perfil farmacocinético caracterizado por un modelo bicompartimental, es decir, una fase de distribución rápida tras la inyección y, posteriormente, una fase caracterizada por una eliminación lenta<sup>36</sup>. La extravasación de los mAb en los diferentes tejidos de un organismo ocurre fundamentalmente por difusión a través de procesos convectivos (flujo de fluidos desde la sangre a los espacios intersticiales), aunque otros factores como la endocitosis pueden afectar a la distribución<sup>36,37</sup>. El porcentaje de anticuerpo que abandona la circulación hacia la mayoría de los tejidos oscila en el rango de 5-15 %, excepto para el cerebro que es mucho más bajo<sup>38</sup>. Por ello, las concentraciones de mAb en el plasma son muchísimo más altas que en el fluido intersticial durante el estado estacionario<sup>37</sup>. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de los tejidos, el cáncer tiene un mecanismo propio por el que las IgG y otras moléculas de gran tamaño, entre 10-200 nm, incluso inespecíficas, se acumulan en el entorno tumoral. Este fenómeno es conocido como efecto de permeabilidad y retención aumentada (efecto EPR) y es debido a una vasculatura tumoral fenestrada y a la pérdida de vasos linfáticos<sup>39</sup>. Los anticuerpos son degradados a péptidos y aminoácidos por procesos catabólicos que fundamentalmente pueden ocurrir por dos rutas: a través del sistema reticuloendotelial (aclaramiento inespecífico), principalmente en el hígado, y a través de las células tumorales que expresan e internalizan la diana del mAb (aclaramiento específico)<sup>36,37</sup>. El aclaramiento inespecífico incluye la captación celular por pinocitosis y el consiguiente catabolismo proteico; este aclaramiento es lento y dada su gran capacidad para no saturarse, ocasiona una farmacocinética lineal<sup>36</sup>. En esta vía influye el receptor Fc-neonatal (FcRn), el cual recicla el anticuerpo de la superficie celular y lo libera de nuevo al fluido celular, prolongando la semivida biológica del anticuerpo. Este receptor, en adultos, se encuentra en células endoteliales, hepatocitos, macrófagos, monocitos y células dendríticas del sistema reticuloendotelial<sup>37,40</sup>. Asimismo, también es posible que el receptor FcγR intervenga significativamente en la eliminación del anticuerpo si este es capaz de formar complejos inmunes solubles que contengan tres o más moléculas de IgG y en casos donde el anticuerpo se una a células suspendidas en la sangre u otros fluidos del organismo (quizás incluyendo virus, bacterias, plaquetas, eritrocitos y leucocitos)<sup>34</sup>. El aclaramiento mediado por la diana o específico puede contribuir de manera significativa a la cinética de distribución y eliminación del anticuerpo<sup>34</sup>. Varios aspectos de la biología de la diana tales como si es soluble o se encuentra unida a membrana, su distribución, nivel de expresión, tasa de recambio o su regulación tanto positiva como negativa, pueden tener importancia en el aclaramiento específico de anticuerpos. En el caso de antígenos solubles, la farmacocinética es lineal cuando sus niveles son bajos mientras que, si son elevados, se observa una farmacocinética no lineal; para antígenos presentes en la membrana celular, la farmacocinética es no lineal hasta que se sature la diana, es decir, a dosis altas del anticuerpo<sup>36</sup>.

La unión al antígeno de manera específica y su gran fuerza de unión (avidez), junto con su capacidad citotóxica, dependiente de células o del complemento ha hecho de los anticuerpos IgG buenos candidatos como herramientas tanto diagnósticas como terapéuticas. El desarrollo de la producción de mAb, gracias a la tecnología del hibridoma y a las nuevas herramientas de biología molecular, ha proporcionado un amplio crecimiento de su uso clínico. Los anticuerpos elaborados por esta metodología se han usado para bloquear receptores de membrana celular, unirse a factores presentes en el suero y evitar su unión a receptores, o para inducir señales intracelulares. Además, se les ha conjugado con moléculas citotóxicas, toxinas o radionúclidos para aumentar su capacidad terapéutica. La oncología es una de las áreas que más se ha beneficiado de sus propiedades, por ejemplo, el uso de mAb dirigidos a HER2 en el cáncer de mama o los anticuerpos anti-CD20 y anti-CD52 en linfomas y leucemias<sup>33</sup>. Las limitaciones que presentan las IgG intactas en cuanto a su distribución y farmacocinética han propiciado el desarrollo de distintos tipos de fragmentos de anticuerpos con propiedades que pueden resultar muy útiles en imagen molecular (tabla 1)<sup>41-43</sup>.

**Tabla 1.** Tipos de fragmentos de anticuerpo y sus principales características

Nombre	IgG intacto	F(ab') <sub>2</sub>	Minibody	Fab	Diabody	scFv	Nano-body	Affibody
PM (kDa)	150-160	110	75	50-55	50	28	12-15	7
Valencia	Bivalente	Bivalente	Bivalente	Monovalente	Bivalente	Monovalente	Monovalente	Monovalente
t <sub>1/2</sub>	1-3 semanas	8-10 horas	5-10 horas	12-20 horas	3-5 horas	2-4 horas	30-60 minutos	30-60 minutos
Ruta metabólica	Hepática	Hepática	Hepática	Renal	Renal	Renal	Renal	Renal

## 2.3. Radioquímica I: radioisótopos

Una vez elegida una sonda molecular (anticuerpo intacto) adecuada para la diana, se tiene que decidir cuál es el radioisótopo positrónico (tabla 2) que mejor se adapta al estudio de inmunoPET. Los cuatro emisores de positrones más usados en aplicaciones clínicas e investigación preclínica de imagen molecular son radioisótopos del flúor (<sup>18</sup>F), el carbono (<sup>11</sup>C), el nitrógeno (<sup>13</sup>N) y el oxígeno (<sup>15</sup>O). Estos radionúclidos poseen una serie de propiedades que los hacen muy útiles en imagen molecular como, por ejemplo, la sustitución directa en las biomoléculas sin apenas alterar su comportamiento biológico<sup>44</sup>. Sin embargo, no son apropiados para inmunoPET porque su periodo de semidesintegración (de 2,1 a 109 minutos) no se empareja bien con la semivida de eliminación del anticuerpo intacto (7-21 días), obteniendo imágenes de muy bajo contraste ya que a tiempos cercanos (hasta, aproximadamente, 24 horas) a la administración del anticuerpo marcado, este todavía no se ha aclarado suficientemente de la circulación sistémica<sup>45</sup>. No obstante, el <sup>18</sup>F puede ser útil en el marcaje de fragmentos de anticuerpos, por su baja t<sub>1/2</sub>, ya que posee una química muy conocida y unas excelentes características de imagen<sup>46-48</sup>.



El radionúclido halógeno más interesante para la inmunoPET con anticuerpos intactos es el  $^{124}\text{I}$ . Este radioisótopo tiene un periodo de semidesintegración de 4,175 días, muy apropiado dada la semivida de eliminación de los mAb. El marcaje con este radioisótopo, como en el caso anterior, puede realizarse de forma directa intercambiando un hidrógeno de la proteína por el yodo radiactivo. Sin embargo, debido a la alta energía y a la baja probabilidad de emisión de sus positrones, además de la emisión de fotones gamma adicionales cercanos a 511 keV presenta problemas en la calidad y cuantificación de las imágenes PET. Otro problema de este radioisótopo es su poca estabilidad en las moléculas marcadas que se internalizan debido a la desyodación por las deshalogenasas en el interior de las células<sup>49</sup>. Por ello, no es la mejor elección para los radiotrazadores que se internalizan, aunque puede ser una buena opción para moléculas de internalización lenta debido a que su baja retención en los tejidos no diana puede generar un buen contraste de imagen<sup>50</sup>.

Dentro del grupo de los radiometales, los más populares para la inmunoPET son el  $^{64}\text{Cu}$  y el  $^{89}\text{Zr}$ . El  $^{64}\text{Cu}$  tiene un periodo de semidesintegración de 12,701 horas mientras que el  $^{89}\text{Zr}$  lo tiene de 78,41 horas. Este es el principal motivo por el que el  $^{89}\text{Zr}$  es el radiometal de elección en el marcaje de anticuerpos intactos dejando el  $^{64}\text{Cu}$  como una buena opción para fragmentos de anticuerpo como los minibodies<sup>51</sup>. El  $^{89}\text{Zr}$ , como el  $^{124}\text{I}$ , posee una baja probabilidad de emisión de positrones, pero tiene una mejor resolución de imagen gracias a la baja energía de sus positrones<sup>22,46</sup>. Además, el  $^{89}\text{Zr}$  residualiza en el interior de las células si la diana y la sonda se internalizan, aumentando el contraste de la imagen con el tiempo. A diferencia de los radioisótopos halógenos, estos radiometales se tienen que unir de manera indirecta a través de un agente quelante<sup>22</sup>. Aunque en las aplicaciones con anticuerpos, los radiometales vistos anteriormente son los más utilizados, hay otros con un periodo de semidesintegración corto que se pueden utilizar en inmunoPET para marcar fragmentos de anticuerpo, tales como el  $^{68}\text{Ga}$  y el  $^{44}\text{Sc}$ ; la principal ventaja de estos es que pueden ser producidos por un generador, lo que les hace adecuados para ser utilizados en cualquier centro de investigación o clínico, sin la necesidad de tener un ciclotrón en su instalación<sup>47,52-55</sup>.

**Tabla 2.** Características de los principales radioisótopos utilizados en inmunoPET

Radioisótopo	$^{18}\text{F}$	$^{64}\text{Cu}$	$^{89}\text{Zr}$	$^{124}\text{I}$	$^{68}\text{Ga}$	$^{44}\text{Sc}$
Periodo de semidesintegración	109,77 min	12,701 h	78,41 h	4,175 d	67,71 min	4,042 h
Modo de decaimiento (probabilidad en %)	$\beta^+(100)$	$\epsilon + \beta^+(61,5)$ $\beta^+(17,60)$ $\beta^-(38,5)$	$\epsilon + \beta^+(100)$ $\beta^+(22,74)$	$\epsilon + \beta^+(100)$ $\beta^+(22,7)$	$\epsilon + \beta^+(100)$ $\beta^+(89,14)$	$\epsilon + \beta^+(100)$ $\beta^+(94,27)$
Energía media del positrón (keV)	249,8	278,21	395,5	687,04 974,74	836,02	632
Energía máxima del positrón (keV)	633,5	653,03	902	1534,9 2137,6	1899	1474,3
Probabilidad de emisión de positrones (%)	96,73	17,6	22,74	11,7 10,7	87,94	94,27
Energía del rayo gamma en keV (probabilidad de emisión en %)	511(193,5)	511(35,2)	511(45,5) 909,2(99)	511(45,5) 602,7(62,9) 722,8(10,4)	511(178,3)	511(188,54) 1157(99,88)
Método de producción	Ciclotrón	Ciclotrón	Ciclotrón	Ciclotrón	Ciclotrón Generador	Ciclotrón Generador

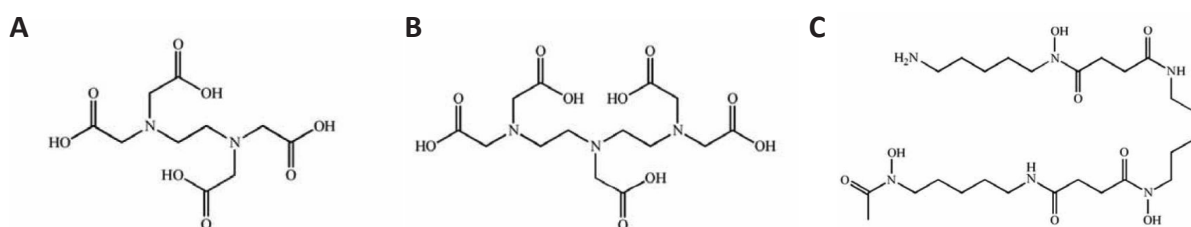
Decaimiento  $\beta^+$  ( $\beta^+$ ) y captura electrónica ( $\epsilon$ )

## 2.4. Radioquímica II: quelantes del $^{89}\text{Zr}$

El marcaje con radiometales requiere el uso de agentes quelantes, como se ha visto en el apartado anterior. Estos compuestos son capaces de secuestrar metales y se han usado tradicionalmente para tratar la intoxicación con metales pesados<sup>56</sup>. Los quelantes deben ser bifuncionales, es decir, una molécula que además de poseer pares de electrones libres para la quelación del radioisótopo tenga un segundo grupo funcional reactivo capaz de unirse covalentemente a la molécula de interés<sup>57</sup>.

En los primeros estudios de marcaje con  $^{89}\text{Zr}$  se emplearon algunos de los quelantes bifuncionales más comúnmente utilizados como, por ejemplo, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el pentaacetato de dietilentriamina (DTPA) (figuras 4 A y B, respectivamente). El  $^{89}\text{Zr}$  se une al EDTA a través de dos átomos de nitrógeno, cuatro átomos de oxígeno y dos moléculas de agua externas; mientras que, en el DTPA, se une a través de tres nitrógenos y cinco oxígenos que posee en su estructura<sup>22</sup>. Los valores de las constantes de estabilidad termodinámica ( $\log K$ ) son 29,4 para el Zr-EDTA a 25 °C y 35,8 para Zr-DTPA a 20 °C en agua<sup>58</sup>. La mayor estabilidad termodinámica del Zr-DTPA probablemente sea debida al hecho de que forma enlaces de coordinación con todos sus átomos, mientras que el EDTA requiere de dos moléculas de agua externas<sup>22</sup>. A pesar de esto, el uso de DTPA como agente quelante para el radiomarcaje con  $^{89}\text{Zr}$  de un anticuerpo mostró un rendimiento de marcaje por debajo del 0,1 %<sup>59</sup>.

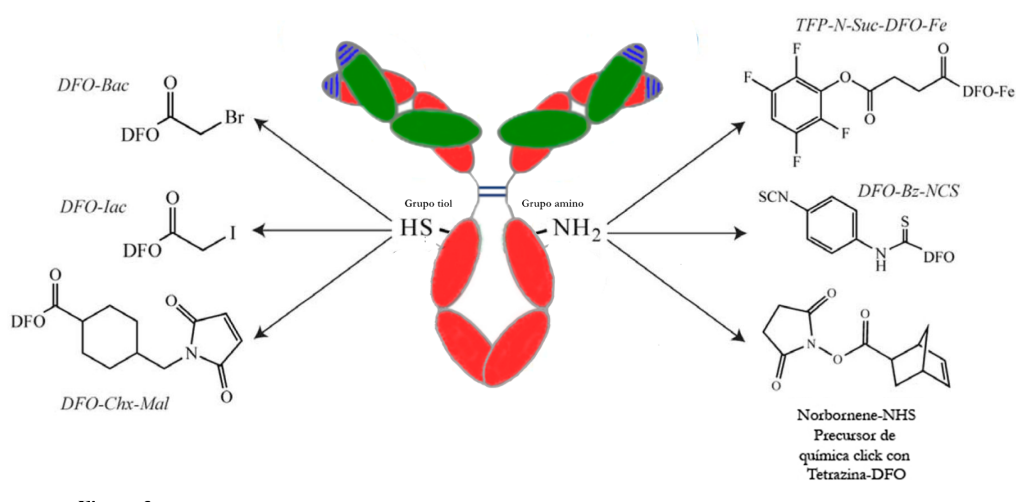
La deferoxamina (DFO, figura 4 C) se empezó a utilizar como quelante en el marcaje de anticuerpos con  $^{89}\text{Zr}$  en 1992, ya que se demostró que poseía mejores propiedades que el DTPA<sup>60</sup>. Asimismo, se utiliza como antídoto en el ámbito clínico para las intoxicaciones con aluminio o hierro, por lo que no requiere estudios adicionales de toxicidad<sup>61</sup>. La DFO contiene tres grupos hidroxamatos que enlazan el  $^{89}\text{Zr}$  al igual que otros radiometales, como el  $^{68}\text{Ga}$ , a través de 6 átomos de oxígeno; además, se necesitan 2 moléculas de agua adicionales para formar un complejo octadentado termodinámicamente estable<sup>22,62-64</sup>. La unión de DFO con  $^{89}\text{Zr}$  ha demostrado que tiene una rápida cinética y un elevando rendimiento de marcaje en una ratio quelante:metal 1:1 y que posee una buena estabilidad a las 24 horas en suero<sup>60</sup>. Asimismo, se ha comprobado que la estabilidad de la unión del complejo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO al anticuerpo puede variar según el método de conjugación al anticuerpo<sup>65</sup>. El complejo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO es parcialmente inestable *in vivo*, el  $^{89}\text{Zr}$  se libera del quelante para incorporarse a las proteínas del plasma y posteriormente depositarse en el hueso. La acumulación en hueso se ha descrito que oscila desde el 3 % hasta el 15 % entre las 72 y las 168 horas posadministración<sup>66</sup>. Esta situación hace que no sea un quelante ideal, por ello, se está investigando activamente en el desarrollo de otros compuestos con mejores propiedades como la hidroxipiridinona (HOPO)<sup>67</sup>.



**Figura 4.** Estructura química de compuestos quelantes. **A.** EDTA, **B.** DTPA y **C.** DFO. Extraído de Melissa A. Deri *et al.* (2013).

La conjugación de la DFO al anticuerpo se realiza fundamentalmente por dos vías: la unión a través del grupo amino de la cadena lateral de las lisinas y la unión por el grupo tiol de la cadena lateral de las cisteínas (figura 5)<sup>66</sup>. Para la unión a través del grupo amino de la lisina se recurre a DFO-succinil-N-TFP (N-suc-DFO) coordinada

con un átomo de hierro (Fe) o p-isotiocinatobencil-DFO (DFO-Bz-NCS), siendo la metodología de conjugación de este último derivado de la DFO más sencilla y rápida<sup>26,27,68</sup>. La DFO-Bz-NCS se une al residuo de lisina del anticuerpo, sin modificarlo, a través de un enlace tiourea estable<sup>26</sup>. El problema de estos métodos es que la DFO se conjuga de manera inespecífica, pudiendo afectar a la inmunoreactividad del anticuerpo. Por ello, se desarrolló un sistema de conjugación basado en la unión a los grupos tioles de cisteínas insertadas en el anticuerpo por ingeniería de proteínas. Algunos compuestos utilizados por esta metodología son la bromoacetamido-DFO (DFO-Bac), la iodoacetamino-DFO (DFO-Iac) y la maleidociclohexil-DFO (DFO-Chx-Mal)<sup>69</sup>. Por último, también se ha desarrollado un método de conjugación de DFO a partir de la unión a residuos de lisina por química click<sup>70</sup>.



**Figura 5.** Esquema de las principales estrategias de conjugación de DFO. Izquierda, estrategias basadas en métodos de unión a través del grupo tiol de las cisteínas. Derecha, estrategias basadas en métodos que se unen a través del grupo amino de las lisinas. Modificado de Melissa A. Deri et al. (2013).

### 3. La diana: MT1-MMP

La elección de la metaloproteasa 14 (MMP-14 o MT1-MMP) como diana para inmunoPET deriva de la colaboración con diversos grupos de investigación del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y del Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas (CNIC). Estos comprobaron mediante inmunohistoquímica en muestras humanas de Glioblastoma Multiforme (GBM) que tenían una mayor expresión de MT1-MMP cuando se comparaban con los gliomas de bajo grado (anexo 2). Además, observaron el mismo patrón en la base de datos de pacientes REMBRANDT, altos niveles de expresión del mRNA de MT1-MMP en GBM frente al de gliomas de bajo grado. Asimismo, los altos niveles de MT1-MMP en pacientes de GBM se asociaban con un peor pronóstico y menor tiempo de supervivencia. Esta correlación entre la expresión de MT1-MMP y el grado de malignidad ha sido confirmada por diversos estudios sugiriendo que esta proteína podría ser un interesante biomarcador para determinar el tipo y grado de un tumor específico<sup>71-77</sup>. Posteriormente, se decidió ampliar el estudio de inmunoPET dirigido a MT1-MMP a modelos de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) debido a su alta expresión en muestras de origen humano y su contribución a la progresión tumoral<sup>78</sup>.

#### 3.1. Estructura y función

La MT1-MMP es una enzima que participa en la degradación de los componentes de la matriz extracelular y pertenece al grupo de las metaloproteasas o metaloproteinasas (MMP) y, dentro de estas, a las MMP asociadas a

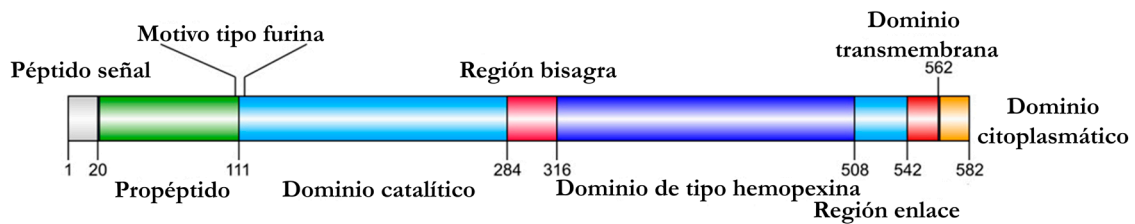
membrana plasmática (MT-MMP). Esta proteasa transmembrana de tipo I dependiente de zinc fue la primera de las MT-MMP en ser descubierta y se la caracterizó como un activador de pro-MMP-2 en la superficie celular<sup>79</sup>. Muchos tipos celulares, además de las células cancerígenas, expresan esta proteína: células madre mesenquimales, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, condrocitos, células epiteliales, células endoteliales, adipocitos, células mieloides, células neuronales, células T y células B<sup>80</sup>. En los ratones MT1-MMP deficientes se ha comprobado que su carencia genera problemas en el desarrollo de varios tejidos (esquelético, glándulas submandibulares, pulmones y angiogénesis), y padecen fibrosis de tejidos blandos<sup>81-84</sup>.

La estructura consiste en un péptido señal, un propéptido, un dominio catalítico, una región bisagra, un dominio tipo hemopexina, una región enlace y un dominio transmembrana tipo I seguido de una cola citoplasmática corta<sup>85-90</sup>. Entre el propéptido y el dominio catalítico contiene un motivo de reconocimiento de furina (figura 6 A). Esta secuencia es reconocida y cortada por las convertasas de proproteínas en el interior de la célula, de tal manera que MT1-MMP se activa intracelularmente<sup>91-93</sup>. Esta enzima no solo tiene actividad proteolítica, ya que el dominio citoplasmático está involucrado en varios eventos celulares como la activación de rutas de transducción o el tráfico de proteínas a áreas puntuales de la superficie celular<sup>93,94</sup>.

La MT1-MMP es la MT-MMP que posee mayor variedad de sustratos, especialmente frente a compuestos de la matriz extracelular. Esta puede degradar las fibras de colágeno incluyendo los tipos I, II y III pero no degrada colágeno tipo IV, que es el mayor componente de la membrana basal. Otros de sus sustratos son pro-MMP-2, pro-MMP-13, ADAM-9, gelatina, fibronectina f, vitronectina, laminina -1,-2/4,-5, fibrinógeno/fibrina, alpha1PI, perlecano, CD44, ICAM-1, tTG, SLP1, CTGF, DR6, DJ-1, galectina-1, Hsp90alpha, pentraxina 3, progranulina, Cyr61, peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa, dickkopf-1, KiSS-1 y Dll1<sup>80</sup>.

La importancia de MT1-MMP en la proteólisis pericelular demanda una estricta y compleja regulación en la que además de intervenir mecanismos regulatorios de la expresión genética también participan otros procesos como la localización en la superficie celular, la endocitosis y el reciclaje, la dimerización, la inhibición y el corte y eliminación de la superficie celular<sup>80</sup>. MT1-MMP es la única MMP que puede promover directamente la invasión celular en matrices ricas en colágeno, por ello, puede localizarse en estructuras de membrana implicadas en la migración celular como los lamelipodios, filopodios o invadopodios<sup>95-99</sup>. La endocitosis y el reciclaje de MT1-MMP en la membrana plasmática son productos de un mecanismo regulatorio complejo que determina la cantidad de proteasa activa en la superficie celular<sup>100-102</sup>. La MT1-MMP tiene una vida media en la superficie celular de 30 minutos siendo endocitada a través de caveolas o vesículas de clatrina<sup>103-106</sup>. El dominio citoplasmático parece esencial en la regulación de los procesos de internalización y redistribución de esta proteína<sup>106</sup>. Otro de los mecanismos de regulación, la homodimerización, ocurre a través del dominio tipo hemopexina y el dominio transmembrana. Este evento es crucial tanto para la activación de pro-MMP2 como para la degradación de colágeno<sup>107,108</sup>. La actividad de MT1-MMP está regulada también por los inhibidores tisulares endógenos de MMP (TIMP), entre los que destaca TIMP-2, el cual es necesario para la activación de pro-MMP-2 aunque no interviene en la de pro-MMP13<sup>80,109,110</sup>. Por último, la MT1-MMP activa (~57 kDa) puede ser procesada por MMP-2 y por otras MT1-MMP (autocatálisis) generando un fragmento de 44-45 kDa unido a la membrana celular y liberando un fragmento soluble (18 kDa) que contiene el dominio catalítico de MT1-MMP inactivo<sup>111-113</sup>. Además, existe un mecanismo no-autocatalítico para el corte de MT1-MMP que posiblemente sea mediado por una ADAM. Para completar el complejo cuadro regulatorio de la actividad de MT1-MMP hay un tercer mecanismo de eliminación de fragmentos no-autocatalítico

## A. Estructura MT1-MMP



## B. Mecanismos de corte y liberación

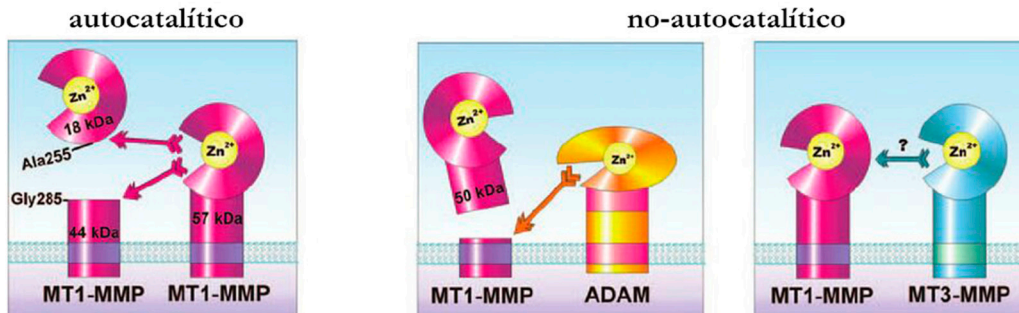


Figura 6. A. Estructura de MT1-MMP. B. Mecanismos de corte y liberación de MT1-MMP autocatalíticos (izquierda) y no-autocatalíticos (derecha).

que parece está relacionado con la coexpresión de MT1-MMP y MT3-MMP como se ha visto en células del músculo liso y que tal vez pudiera influir en el glioma (figura 6 B)<sup>114</sup>.

### 3.2. El papel de la MT1-MMP en el cáncer

Los altos niveles de expresión de MT1-MMP se han relacionado con la invasividad y malignidad de muchos tumores, entre ellos los gliomas y el cáncer de páncreas (figura 7)<sup>77,115-118</sup>. Esta metaloproteasa interviene en el desarrollo

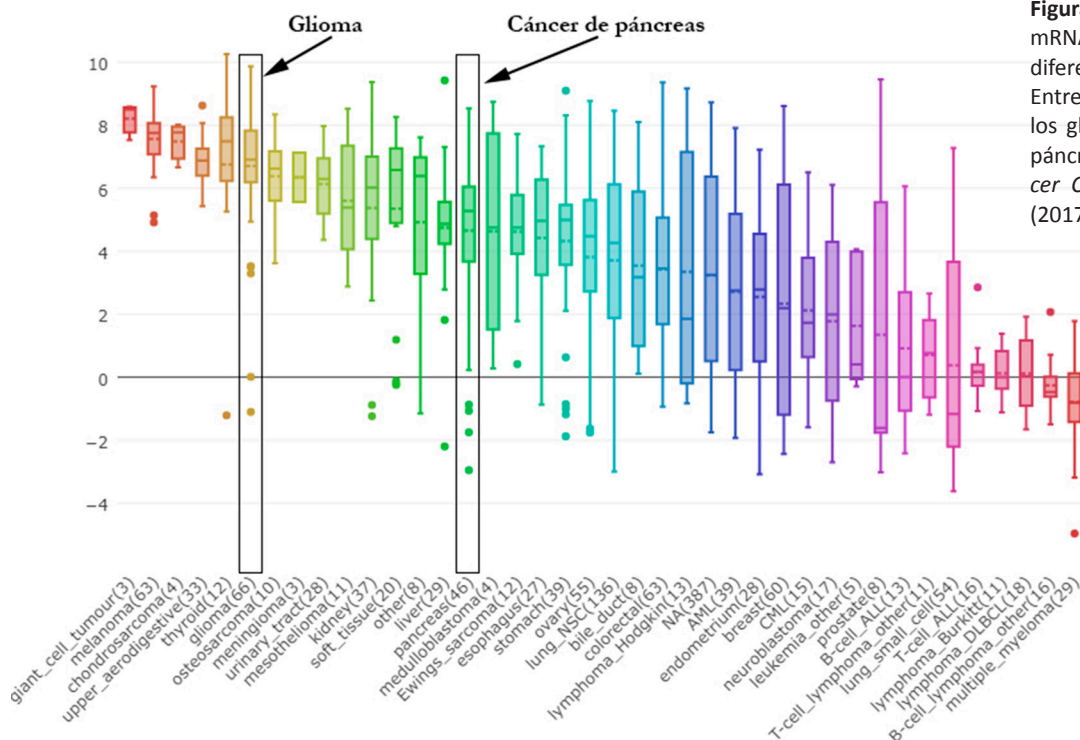


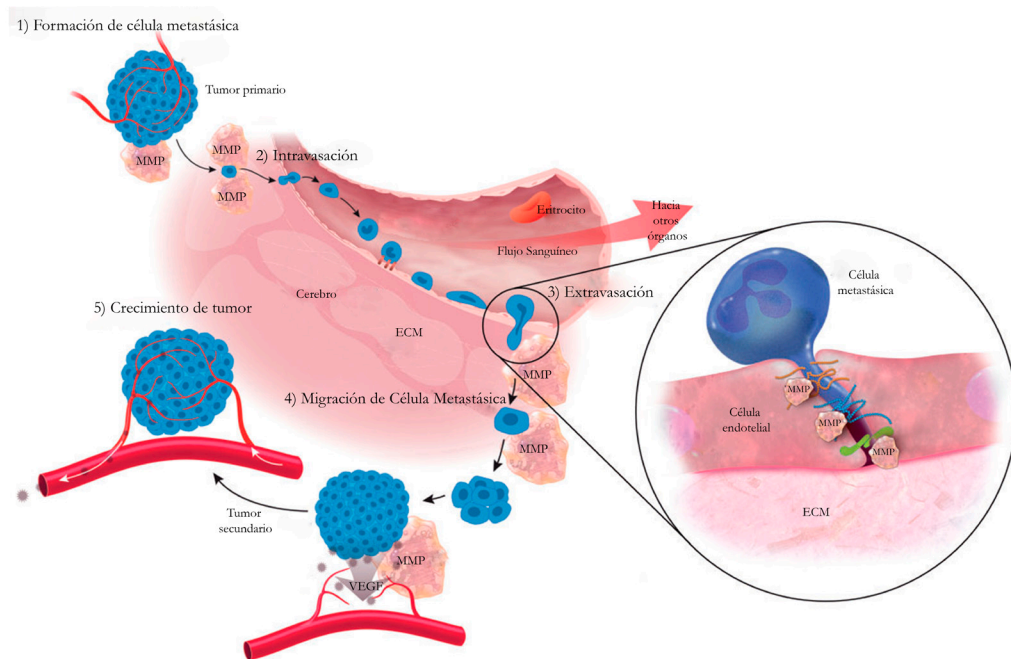
Figura 7. Expresión de mRNA de MT1-MMP en diferentes tipos tumorales. Entre ellos se encuentran los gliomas y el cáncer de páncreas. Extraído de *Cancer Cell Line Encyclopedia* (2017).

del cáncer a través de procesos como la invasión celular, la angiogénesis y la metástasis; además, también puede participar en otras patologías como en problemas de morfogénesis epitelial, desarrollo del esqueleto, curación de heridas y en la obesidad e inflamación<sup>79,81,119-125</sup>.

Muchos estudios han revelado que la sobreexpresión de MT1-MMP potencia la invasión y migración en cáncer<sup>71,79,93,126-129</sup>. En glioma, por ejemplo, se ha demostrado que una de las líneas celulares más invasivas *in vivo*, U251, tiene una mayor expresión de MT1-MMP que otras<sup>126</sup>. Uno de los principales mecanismos por el que MT1-MMP promueve la invasión de los tejidos vecinos es por degradación directa de matriz pericelular formada por colágeno fibrilar. Este es la mayor barrera durante la migración y es resistente a determinadas proteasas a pH neutro, excepto a algunas de las MMP, entre ellas MT1-MMP<sup>119,130</sup>. Asimismo, la proteólisis puede liberar moléculas biológicamente activas retenidas en la matriz extracelular como, por ejemplo, un fragmento parecido al factor de crecimiento epidérmico (EGF) que estimula el crecimiento y motilidad dependiente del receptor EGF<sup>128-133</sup>. Otro importante mecanismo es a través de la activación de pro-MMP-2. La producción de pro-MMP-2 es mayor en GBM que en astrocitomas de grado bajo, tumores cerebrales metastásicos o cerebros sanos<sup>77,134</sup>. Por último, también tiene mecanismos para promover la migración celular a través del procesamiento de proteínas de superficie celular (CD44, transglutaminasa, proteína relacionada al receptor de LDL o sindecano-1) y de su dominio citoplasmático de manera independiente a la actividad catalítica<sup>135-143</sup>.

En ausencia de MT1-MMP se ha observado que se produce una vascularización defectuosa en placas de crecimiento de cartilago y en el ensayo de angiogénesis corneal<sup>82</sup>. Estos estudios indican la importancia de esta metaloproteasa en el inicio de la angiogénesis. Además, otras MMP activadas a través de MT1-MMP, MMP-2 y MMP-9, son importantes en este proceso<sup>144</sup>. A través de estas enzimas, los mecanismos de degradación de componentes de la matriz extracelular y la membrana basal promueven la angiogénesis. La disrupción de la membrana basal permite la migración de células endoteliales de vasos sanguíneos ya existentes a vasos sanguíneos de nueva formación; en este proceso se liberan de factores unidos a la matriz extracelular como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que es el principal factor que estimula la angiogénesis. Además, se ha visto que el VEGF derivado de células cancerígenas puede inducir la expresión de MT1-MMP y la formación tubular de células endoteliales<sup>145,146</sup>. Asimismo, la sobreexpresión de MT1-MMP puede inducir la transcripción de VEGF vía fosforilación de Src en células tumorales promoviendo la vascularización<sup>147,148</sup>.

La metástasis (figura 8), empieza con una pérdida de conexiones intercelulares y la liberación de células individualizadas o en grupos del tumor a través de la prevención de la apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular (anoikis). Luego, se degradada la matriz extracelular, ocurre la migración celular y la infiltración a través de vasos sanguíneos o linfáticos<sup>149</sup>. Posteriormente, una vez la célula (o células) llega a su destino se producirá una adhesión al endotelio y el crecimiento secundario en la nueva localización. El proceso de metástasis puede iniciarse con la transición epitelio-mesenquimal (EMT) de las células tumorales en las primeras fases de la metástasis, durante el cual pierden su polaridad y adhesión celular a otras células, adoptando una morfología mesenquimal adecuada para la migración. A este proceso se le asocia la sobreexpresión de MT1-MMP y de otras MMP. De esta manera, las células con fenotipo mesenquimal son más independientes del tejido huésped e incrementan su capacidad para metastatizar. Una vez se han desplazado al nuevo tejido, las células del cáncer pueden retornar al fenotipo epitelial<sup>150,151</sup>. Se ha visto en modelos de cáncer de páncreas y pulmón que la EMT no es necesaria para la metástasis. Sin embargo, las células que realizan EMT son más resistentes a quimioterapia y producen más recidivas después del tratamiento<sup>152,153</sup>.

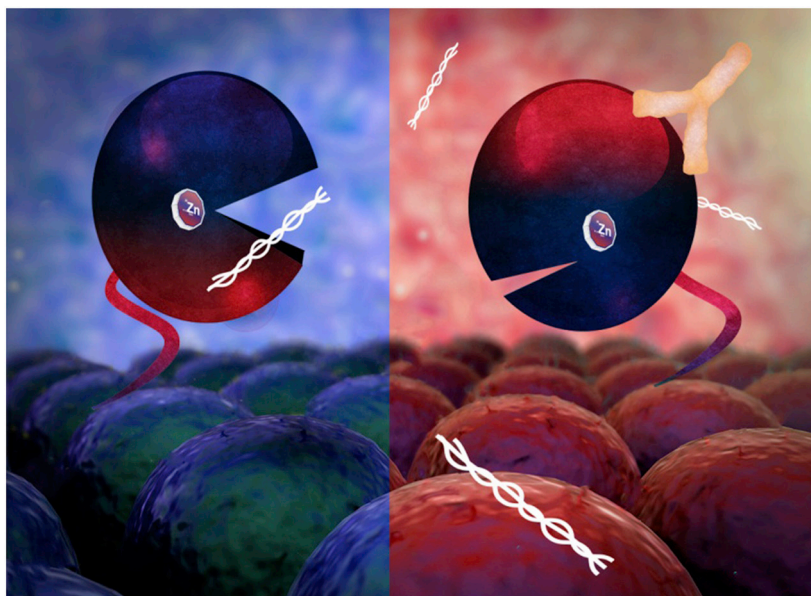


**Figura 8.** MMP en la metástasis de un tumor cerebral. Las MMP participan en muchos de los procesos metastásicos. **1.** Formación de células metastásicas del tumor primario. **2.** Intravasación de células metastásicas a la circulación sanguínea. **3.** Extravasación de células metastásicas a través de la barrera hematoencefálica en el cerebro. **4.** Migración de la célula tumoral en el cerebro. **5.** Las MMP contribuyen al microambiente y angiogénesis tumoral. Modificado de Ralf G. Rempe *et al.* (2016).

### 3.3. Anticuerpos dirigidos a MT1-MMP

La expresión y la actividad de MT1-MMP se ha encontrado alterada varios tipos de cáncer, por lo que se la ha postulado como posible diana terapéutica, entre otras MMP<sup>154,155</sup>. Para superar la limitada especificidad de las moléculas pequeñas inhibitoras de MMP, varios anticuerpos inhibitoras de la actividad de MT1-MMP se han desarrollado con el fin de poder aplicarlos como agentes terapéuticos<sup>156</sup>. Sin embargo, el potencial terapéutico de los anticuerpos anti-MMP todavía no se ha comprobado<sup>157</sup>.

En 2001, Galvez *et al.* inmunizaron ratones con péptidos localizados en dos bucles expuestos del dominio catalítico de MT1-MMP. A través de esta metodología y de la tecnología del hibridoma se desarrolló el anticuerpo LEM 2/15; este mAb del subtipo IgG1 se une al bucle V-B del dominio catalítico en la superficie de MT1-MMP (residuos 218-233)<sup>158</sup>. LEM 2/15 inhibe la mayoría de la actividad colagenasa, sin embargo, no interfiere significativamente en la activación de pro-MMP-2 y en la dimerización de la MT1-MMP en la superficie celular. El mecanismo alostérico de inhibición de la actividad colagenasa se cree que es debido a un cambio conformacional en la proteína al unirse al bucle V-B de la región catalítica (figura 9)<sup>159</sup>. Otro anticuerpo dirigido al dominio catalítico, DX-2400, fue diseñado por la empresa Dyax utilizando la tecnología de despliegue de fagos<sup>160,161</sup>. Este anticuerpo bloquea el procesamiento de pro-MMP2 en el tumor y en las células endoteliales, inhibe la angiogénesis, y disminuye la formación de lesiones metastásicas<sup>160</sup>. Además, DX-2400 también puede potenciar la respuesta a la terapia por radiación<sup>159</sup>. Más recientemente, en 2013, se ha desarrollado el mAb 9E8 que inhibe la activación de pro-MMP-2 dependiente de MT1-MMP sin afectar al resto de las funciones catalíticas<sup>163</sup>. Este anticuerpo interfiere con la unión de TIMP-2, previniendo la formación del complejo MT1-MMP-TIMP-2-pro-MMP-2, necesario en la activación de pro-MMP-2<sup>164</sup>.



**Figura 9.** Mecanismo de acción de LEM 2/15. Izquierda, MT1-MMP unida a la membrana plasmática realizando su actividad proteolítica sobre un sustrato. Derecha, al unirse LEM 2/15 al sitio alostérico se produciría un cambio conformacional que inhibiría la unión del sustrato y así la actividad de MT1-MMP. Extraído de Gregory I. Goldberg (2015).

Además del dominio catalítico, el de tipo hemopexina o la región bisagra se han utilizado como diana para el diseño de anticuerpos. Fragmentos de anticuerpo dirigidos hacia el dominio de tipo hemopexina han inhibido la angiogénesis y la capacidad invasiva de células de cáncer *in vitro*<sup>165</sup>. En 2009, el grupo de Hideo Saji también desarrolló un anticuerpo dirigido al dominio de tipo hemopexina como sonda de imagen marcada con <sup>99m</sup>Tc para SPECT<sup>166</sup>. Posteriormente, el mismo grupo elaboró fragmentos de anticuerpos como estrategia de imagen para SPECT/CT y anticuerpos para fluorescencia cercana al infrarrojo, ambos dirigidos hacia la región bisagra de la MT1-MMP<sup>167,168</sup>.

## 4. Diagnóstico por imagen de tumores cerebrales y cáncer de páncreas

### 4.1. Glioblastoma multiforme

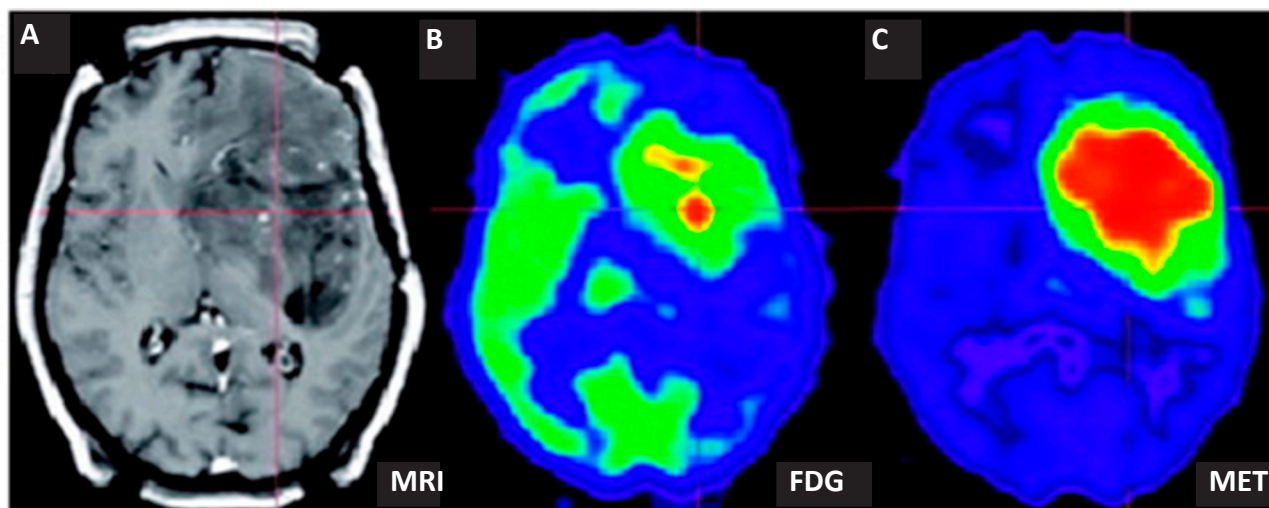
Cada año, aproximadamente, unas 35 000 personas son diagnosticadas con tumores cerebrales primarios en los Estados Unidos<sup>169</sup>. Dentro de estos, el GBM es el tumor maligno más común del sistema nervioso central en adultos<sup>170</sup>. Este engloba el 46,1 % de los tumores cerebrales malignos primarios y solo el 5,5 % de los pacientes sobrevive a los 5 años después del diagnóstico<sup>171</sup>. A pesar de los avances en la biología, el diagnóstico multimodal y las estrategias terapéuticas, el GBM mantiene una alta recurrencia después del tratamiento, su pronóstico es malo, y tiene unas altas morbilidad y mortalidad.

El diagnóstico inicial del GBM está basado en MRI o CT, siendo la MRI el método de referencia para esta patología (figura 4 A). Sin embargo, los protocolos de MRI convencionales son muy inespecíficos y no diferencian directamente las células tumorales de las del tejido sano. Esto hace difícil la caracterización de la lesión cerebral, el establecimiento del pronóstico y limita la detección del tumor infiltrado en el tejido cerebral. La MRI también tiene problemas para diferenciar la pseudoprogresión (incremento del tamaño de la lesión relacionado con el tratamiento, simulando la progresión de la enfermedad) y la pseudorespuesta (reducción de captación del contraste después de una terapia, aunque continúe la progresión del tumor)<sup>172</sup>. Para que los neuropatólogos establezcan el



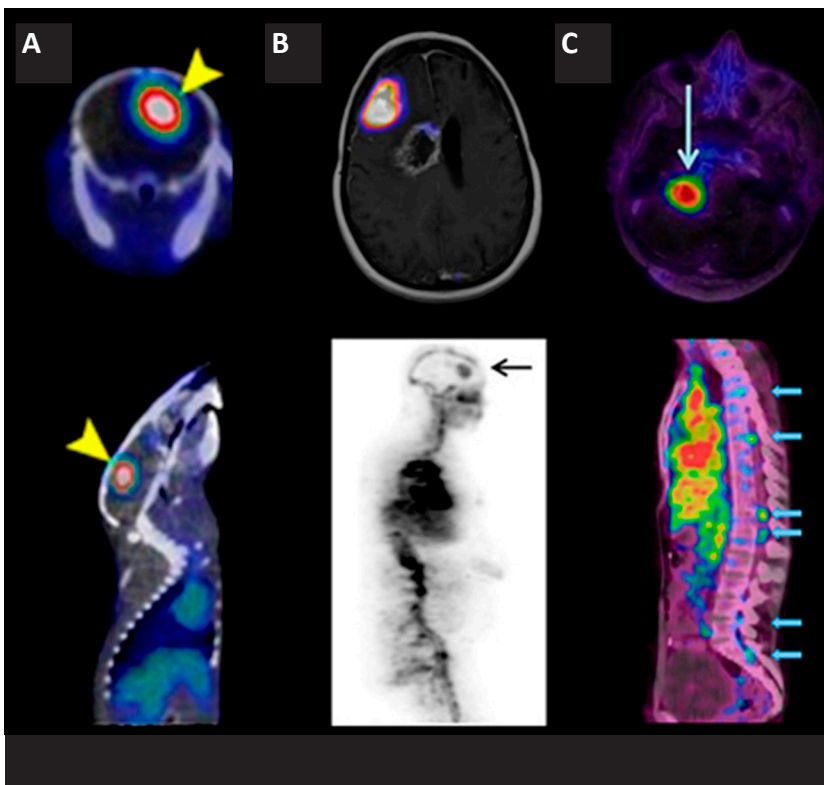
diagnóstico definitivo se ha de realizar una biopsia o estudiar una muestra de tejido extraída después de la cirugía, siendo ambos métodos invasivos. Además, el GBM es altamente variable dentro del mismo tumor a nivel molecular por lo que estos métodos invasivos nos dan una información sesgada según la cantidad de la muestra extraída<sup>173</sup>. Una vez localizado el tumor y diagnosticada su malignidad, los médicos deben determinar el mejor tratamiento posible para el paciente. El tratamiento convencional contempla la cirugía, la radioterapia, y la quimioterapia con temozolomida (TMZ). Actualmente, el anticuerpo bevacizumab está siendo utilizado como terapia en GBM recurrente debido a sus prometedores resultados obtenidos en estudios clínicos en fase II<sup>174</sup>. Una mejora en la radioterapia y el tratamiento con TMZ podría venir derivada de la inhibición de la actividad de MT1-MMP en pacientes que sobreexpresen esta proteína<sup>73</sup>. Otras posibles terapias que podrían tener interés en un futuro son la inhibición de las redes de señales de proliferación y crecimiento oncogénico, la inhibición de la angiogénesis, las dirigidas a la respuesta del estrés oxidativo, la inmunoterapia, las terapias virales y genéticas, y las terapias de aplicación local. En este contexto, los pacientes de GBM podrían beneficiarse del diagnóstico de los procesos moleculares que ocurren dentro de los tumores y determinar cómo afectan al tratamiento<sup>175</sup>.

En algunos centros la imagen PET es complementaria a la MRI en el diagnóstico del GBM<sup>172</sup>. La <sup>18</sup>F-FDG no es el mejor radiotrazador para el diagnóstico de los tumores cerebrales debido a la gran captación de glucosa por parte del cerebro (figura 4 B)<sup>176-178</sup>. Además, con la <sup>18</sup>F-FDG, la capacidad para detectar los tumores recurrentes o residuales es baja durante las primeras semanas tras el tratamiento debido a la necrosis posradiación<sup>179-181</sup>. No obstante, otros radiotrazadores PET como los análogos de aminoácidos son más adecuados que la <sup>18</sup>F-FDG para diagnosticar y monitorizar la respuesta del tumor durante el tratamiento debido a su mayor contraste con el tejido cerebral<sup>182-186</sup>. Dentro de estos, el más estudiado es la <sup>11</sup>C-MET que es capaz de diferenciar la recurrencia tumoral de la necrosis por radiación (figura 4 C)<sup>187,188</sup>. Sin embargo, el <sup>11</sup>C al tener un corto periodo de semidesintegración (20 minutos), obliga al centro de diagnóstico a disponer de un ciclotrón en sus instalaciones. Este último punto hace de la <sup>11</sup>C-MET un radiotrazador poco accesible para muchas unidades de medicina nuclear. Asimismo, la <sup>11</sup>C-MET se acumula en todos los tipos de glioma, por lo que no permite la diferenciación entre los tumores de alto y bajo grado<sup>189</sup>. Otro prometedor radiotrazador basado en los análogos de aminoácidos, la <sup>18</sup>F-fluoroetil-tirosina (<sup>18</sup>F-FET), ha demostrado incrementar la especificidad del diagnóstico de gliomas hasta el 97 % al unirse con la MRI y la espectroscopia por MRI<sup>190</sup>. La <sup>18</sup>F-FLT y el <sup>18</sup>F-FMISO son otros dos radiotrazadores interesantes en el diagnóstico y monitorización de los tumores cerebrales. El <sup>18</sup>F-FLT es un análogo de ácidos nucleicos que ha tenido prometedores resultados en la diferenciación entre la necrosis posradiación y la recurrencia tumoral, además parece superior al <sup>11</sup>C-MET en la gradación del tumor<sup>191,192</sup>. Por último, el <sup>18</sup>F-FMISO es un agente PET derivado de un nitroimidazol que se utiliza en la valoración de la hipoxia, siendo así un marcador fisiológico interesante en progresión tumoral y resistencia a la radioterapia<sup>193,194</sup>.



**Figura 10.** Imagen molecular de un tumor cerebral en un mismo paciente con tres modalidades de imagen. **A.** MRI, método de referencia en el diagnóstico de tumores cerebrales, **B.** PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG, aunque la captación de glucosa es alta en el área tumoral, el contraste entre el tejido sano y el tejido tumoral no es el más adecuado, y **C.** PET con  $^{11}\text{C}$ -MET, este tiene una captación más alta, más extensa y mejor contraste que la  $^{18}\text{F}$ -FDG. Extraído de Olivier Keunen *et al.* (2014).

Aunque las IgG tienen poca distribución en el cerebro (la ratio de la concentración cerebro:plasma es 1:500), el uso de anticuerpos intactos en neurooncología se ha contemplado en caso de que el tumor dañe la barrera hematoencefálica<sup>34,195</sup>. Por ello, varios estudios han investigado la posible utilidad de la inmunoPET en el diagnóstico tanto para GBM como para otros tumores cerebrales. En 2006, Weibo Cai *et al.* evaluaron con éxito el mAb humanizado Abegrin marcado con  $^{64}\text{Cu}$  dirigido a la integrina  $\alpha\text{-V}\beta\text{-3}$  en varios modelos de cáncer en roedores, entre ellos dos líneas celulares de GBM humano y de ratón, U87MG y GL-26 respectivamente<sup>196</sup>. Asimismo, su grupo de investigación desarrolló un radiotrazador dirigido a CD146 en modelos de GBM a través del radiomarcaje del mAb YY146 con  $^{64}\text{Cu}$  y  $^{89}\text{Zr}$ <sup>197,198</sup>. En 2010, la detección de metástasis cerebrales en pacientes de cáncer de mama HER2 positivo por  $^{89}\text{Zr}$ -Trastuzumab demostró la utilidad de la inmunoPET en el diagnóstico clínico de tumores cerebrales<sup>199</sup>. Posteriormente, M. W. den Hollander *et al.* quisieron evaluar la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -fresolimumab y el resultado de su tratamiento en pacientes de glioma de alto grado recurrente. Aunque el tratamiento con fresolimumab no mostró ningún beneficio clínico, los gliomas lo captaron consiguiendo buenas imágenes<sup>200</sup>. Recientemente, en 2016, la inmunoPET también se ha utilizado en neurooncología pediátrica de forma segura,  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab mostró una captación heterogénea en glioma pontino intrínseco difuso (DIPG). En cualquier caso, sus resultados sugirieron que la imagen por inmunoPET puede ser útil en la selección de candidatos para el tratamiento de DIPG por bevacizumab, valorando tanto la disponibilidad de VEGF como su accesibilidad<sup>201</sup>. La publicación de este último estudio se realizó justo un año después del trabajo preclínico con  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab en modelos de DIPG en roedores, demostrando la rápida y exitosa translación que permite la inmunoPET<sup>202</sup>. Por último, la detección de tumores cerebrales también se ha investigado utilizando fragmentos de anticuerpo marcados con  $^{18}\text{F}$  y  $^{44}\text{Sc}$ <sup>203,204</sup>.



**Figura 11.** Imágenes de tumores cerebrales mediante inmunoPET. **A.** Una imagen transversal (arriba) y una sagital (abajo) de un roedor portador de un tumor U87MG a las 48 horas posinyección de  $^{64}\text{Cu}$ -NO-TA-YY146, extraído de Yunan Yang *et al.* (2015). **B.** Imágenes de dos pacientes en un estudio con  $^{89}\text{Zr}$ -fresolimumab: arriba, PET/RM con dos lesiones tumorales potenciadas por contraste, la lesión frontal derecha tiene una mayor captación del radiotrazador que la lesión paraventricular derecha que había sido previamente irradiada; y, abajo, un escáner PET de todo el cuerpo a los 4 días en un paciente con un glioma de alto grado, flecha, extraído de M. W. den Hollander *et al.* (2015). **C.** Imágenes de dos pacientes de un estudio pediátrico de DIPG con  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab: arriba, una imagen fusionada de PET con MRI potenciada en T1 con gadolinio a las 144 horas posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab, en la imagen se aprecia el tumor primario (flecha); y, abajo, imagen de fusión PET/MR de la médula espinal de un paciente con un tumor primario que ha desarrollado metástasis (flechas), extraído de M. H. Jansen *et al.* (2017).

## 4.2. Adenocarcinoma ductal pancreático

El PDAC es un tumor exocrino con una elevada malignidad que tiene su origen en las células del conducto pancreático. Este tipo de tumor representa el 85 %-95 % de todos los cánceres de páncreas diagnosticados<sup>205</sup>. Es la cuarta causa de muerte relacionada con el cáncer en los Estados Unidos y la segunda causa, solo detrás del cáncer colorrectal, de muerte relacionada con un cáncer digestivo<sup>206</sup>. Debido a su rápida progresión, a la poca efectividad del tratamiento y a su mal pronóstico podría llegar a ser en 2030 el segundo cáncer con mayor tasa de mortalidad<sup>207</sup>. El mejor tratamiento es la cirugía resectiva, pero desafortunadamente, solo el 15-20 % de los pacientes son candidatos para una intervención quirúrgica. El principal quimioterápico de elección es la gemcitabina, pero muchos pacientes desarrollan resistencia a este fármaco, posiblemente a través de un mecanismo que está mediado por MT1-MMP<sup>208,209</sup>. No obstante, los avances en imagen radiológica y endoscopia por ultrasonidos han mejorado la capacidad de detección y estadificación permitiendo realizar las intervenciones quirúrgicas de manera más selectiva. En la mayoría de los pacientes, actualmente, los esfuerzos están dirigidos a cuidados paliativos para prolongar la cantidad y calidad de vida<sup>206</sup>.

En lo que respecta al diagnóstico, la CT con contraste yodado intravenoso es la técnica de imagen de referencia al sospechar de un PDAC. La MRI también es útil, aunque no ha demostrado ser superior a la CT<sup>205</sup>. La sensibilidad de la CT para cáncer de páncreas es alta, en torno al 89 %-97 %. Sin embargo, en tumores menores de 2 cm, baja al 65 %-75 % y no detectarlos podría ser un problema ya que cánceres inferiores a 1 cm pueden producir metástasis<sup>210,211</sup>. Para evaluar si un paciente puede ser sometido a cirugía resectiva en caso de posible invasión vascular se realiza un CT o MRI cuyos hallazgos tienen una sensibilidad de 45-85 % y una especificidad de 98-100 %. Además, el CT tiene muy poca sensibilidad en la detección de metástasis en los nódulos linfáticos y detecta con poca exactitud las metástasis hepáticas pequeñas y peritoneales. A un tercio de los pacientes diagnosticados mediante CT, sin metástasis, se les han encontrado pequeñas metástasis hepáticas o peritoneales durante la cirugía<sup>212</sup>.

Las potenciales aplicaciones de la PET en el diagnóstico de cáncer de páncreas incluyen la planificación de la biopsia guiada por imagen, resolver una imagen de CT ambigua, estadificación, recurrencia de tumores y monitorización de la respuesta a la terapia<sup>213</sup>. Hay que tener en cuenta que el valor de la <sup>18</sup>F-FDG al principio del diagnóstico no está bien definido debido a la alta sensibilidad del CT y MRI<sup>214</sup>. Un estudio comprobó que la sensibilidad de la <sup>18</sup>F-FDG-PET a la hora de detectar tumores en el páncreas fue del 92 % mientras que en la <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT aumentó hasta un 96 %<sup>215</sup>. La <sup>18</sup>F-FDG-PET/CT tiene una sensibilidad baja en la detección de metástasis en los nódulos linfáticos (30 %-49 %), pero una sensibilidad y exactitud muy alta en la detección de las metástasis distantes (88 % y 94 %, respectivamente)<sup>216</sup>. Un factor importante para la reseccabilidad del tumor es la detección de implantes peritoneales donde tanto la CT como la <sup>18</sup>F-FDG-PET tienen poca sensibilidad y exactitud<sup>214</sup>. La detección de la recurrencia del tumor después de cirugía es un reto con la CT debido a la alteración de la anatomía y la alta tasa de falsos positivos y negativos. Varios estudios han demostrado que la <sup>18</sup>F-FDG-PET tiene una mayor exactitud en la detección de la recurrencia local del carcinoma pancreático que la CT<sup>217,218</sup>. En este sentido el desarrollo de tecnologías como la PET/MRI puede ofrecer una mejor localización y delineación de la recurrencia de los tumores locales<sup>214</sup>. Otros tipos de cáncer pancreático como los tumores neuroendocrinos (1 %-5 % de todos los tumores pancreáticos) han mejorado significativamente su diagnóstico con el desarrollo de nuevos radiotrazadores basados en el marcaje con <sup>68</sup>Ga<sup>219-221</sup>. Varios estudios PET/CT han encontrado buena exactitud y detección en el diagnóstico de estas lesiones tumorales con radiotrazadores como el <sup>68</sup>Ga-DOTATOC<sup>214</sup>.

La inmunoPET aplicada al cáncer de páncreas se ha desarrollado, fundamentalmente, en el ámbito preclínico. Sugyo *et al.* marcaron con <sup>89</sup>Zr el mAb TSP-A01 dirigido al receptor de transferrina. Este radiotrazador ha demostrado mucho potencial para la selección de pacientes para la terapia antitransferrina<sup>222</sup>. Otro estudio con <sup>89</sup>Zr empleó el anticuerpo 059-053 dirigido a CD147, diana involucrada en la activación de algunas MMP, donde se observó la inhibición de la proliferación de las células de cáncer de páncreas. En este trabajo se mostró una captación de  $16,9 \pm 3,2$  % de la dosis inyectada (ID)/g y 8,6 % ID/g a los 6 días posinyección en modelos xenograft subcutáneos y ortotópicos de cáncer de páncreas, respectivamente<sup>223</sup>. Viola-Villegas *et al.* marcaron el anticuerpo 5B1 dirigido al antígeno CA19.9 con <sup>89</sup>Zr y evaluaron la detección y estadiaje del cáncer con una mayor captación para <sup>89</sup>Zr-DFO-5B1 que para <sup>18</sup>F-FDG ( $30,7 \pm 6,6$  % ID/g vs.  $4,8 \pm 1,3$  % ID/g a las 2 horas posinyección)<sup>224</sup>. Además del <sup>89</sup>Zr, el <sup>64</sup>Cu también se ha utilizado para estudios de inmunoPET en este tipo de cáncer<sup>225</sup>.

# OBJETIVOS

---

El glioblastoma y el adenocarcinoma ductal de páncreas son, actualmente, dos de los tumores con mayor mortalidad a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento durante las últimas décadas. La mejora en el diagnóstico de estas patologías, junto con un mayor conocimiento de su fisiología, podría ayudar tanto en la selección y monitorización del tratamiento como en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que podrían incrementar las tasas de supervivencia de los pacientes. Dentro de las diversas modalidades de imagen biomédica, la inmunoPET es una técnica emergente que aúna la especificidad de los anticuerpos por antígenos concretos y la sensibilidad de la PET. Esta técnica, además de ser muy valiosa en la localización y delimitación de tumores, puede ser muy útil en la planificación de la radioinmunoterapia.

La enzima transmembrana MT1-MMP se sobreexpresa en muchos tipos de tumores, entre ellos GMB y PDAC. En relación con el glioblastoma, esta proteína podría ser utilizada como biomarcador para determinar el tipo y grado de un glioma. En cuanto al cáncer de páncreas, su sobreexpresión en PDAC parece estar relacionada con la resistencia a gemcitabina (antineoplásico utilizado habitualmente en el tratamiento de PDAC), siendo su detección, de esta manera, útil en la personalización del tratamiento. Asimismo, como otras metaloproteasas, se ha propuesto su utilización como diana terapéutica. En este marco, la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética del CIEMAT junto con diferentes grupos de investigación del CNIO decidieron desarrollar una sonda de imagen para inmunoPET basada en un anticuerpo que se une específicamente a MT1-MMP, denominado LEM 2/15, como estrategia de diagnóstico de diferentes tipos de cáncer. A su vez, dada la capacidad que tiene dicho anticuerpo para inhibir la actividad catalítica de MT1-MMP y el papel importante que juega esta metaloproteasa en el desarrollo tumoral, podría ser utilizado en el tratamiento del cáncer.

Los objetivos que se pretende alcanzar en esta tesis doctoral son:

1. Obtener una sonda de imagen PET apropiada. Para ello, se conjugará el anticuerpo LEM 2/15 con un agente quelante (DFO) y, posteriormente, se marcará el anticuerpo conjugado (DFO-LEM 2/15) con un radionúclido emisor de positrones ( $^{89}\text{Zr}$ ). Finalmente, se evaluará su estabilidad radioquímica e inmunoreactividad. Se realizará el mismo proceso con una IgG del mismo isotipo que LEM 2/15.
2. Realizar un estudio de biodistribución *ex vivo* y de imagen PET en un modelo xenograft heterotópico subcutáneo de GBM con el fin de evaluar la capacidad de la técnica PET para cuantificar la captación del radiotrazador en los diferentes tejidos del organismo.
3. Realizar estudios de imagen molecular mediante inmunoPET en diferentes modelos de cáncer de GBM.
4. Realizar estudios de imagen molecular mediante inmunoPET en diferentes modelos de cáncer de PDAC.
5. Realizar un análisis farmacocinético mediante PET del  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en modelos animales de GBM y PDAC.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. Anticuerpos

### 1.1. LEM2/15

El mAb LEM 2/15 fue generado por el grupo de la Dra. Alicia G. Arroyo del Hospital de la Princesa (Madrid), actualmente en el laboratorio de Metaloproteinasas de Matriz en Angiogénesis e Inflamación del CNIC, según la tecnología del hibridoma. Para ello, se inmunizaron ratones BALB/C con el péptido modificado CAEPWTVRNEDLNGNDIC (LEM-2), localizado dentro del *loop* expuesto del dominio catalítico de MT1-MMP<sup>158</sup>. Una vez establecido el hibridoma productor del anticuerpo específico (LEM 2/15, subclase IgG1), se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) y 2,5 % de un medio selectivo compuesto por hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT).

La purificación de LEM 2/15 secretado corrió a cargo del Dr. Jorge L. Martínez-Torrecuadrada de la Unidad de Cristalografía e Ingeniería de Proteínas del CNIO. El sobrenadante se extrajo del cultivo de hibridomas y se pasó a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sarstedt). A continuación, se purificó por cromatografía de afinidad en columnas de proteína A mediante un colector de fracciones Atka system (GE Healthcare). Posteriormente, las fracciones de interés se reunieron y dializaron frente a dos litros de tampón fosfato salino (PBS). La muestra se cuantificó con un ensayo de Bradford (Bio-Rad). Cuando fue necesario, la proteína purificada se concentró con un concentrador centrífugo (Vivaspin) centrifugando a la velocidad recomendada por el fabricante hasta 4 mg/ml aproximadamente. Por último, el anticuerpo se guardó en alícuotas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 1.2. IgG inespecífica

En los estudios de imagen se utilizó un anticuerpo de unión inespecífica del subtipo IgG1 del clon MOPC-21 de mieloma murino (2BScientific) como control negativo para compararlo con LEM 2/15.

## 2. Líneas celulares

### 2.1. Glioblastoma multiforme

Las líneas celulares y neuroesferas de GBM cultivadas por el Dr. Alberto J. Schuhmacher, del grupo de tumores cerebrales de la Fundación Seve Ballesteros (CNIO), fueron cedidas por los laboratorios del Dr. Holland y el Dr. Mellinshoff del *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC) en 2012. Las líneas celulares U251, T98G, U87-MG, SF-268 y SF-295 se cultivaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en atmósfera enriquecida con 5 %  $\text{CO}_2$  en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con FBS al 10 %. Las neuroesferas TS516, TS543, TS568 y TS676 se cultivaron en suspensión en el medio basal NeuroCult<sup>TM</sup> NS-A (NSC) con el suplemento de proliferación NSC, 1 mg/ml de heparina (Stem Cell Technologies), 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano recombinante

(Invitrogen) y 20 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) básico humano recombinante (Sigma). Las esferas de tumores primarios se recogieron, se disgregaron mecánicamente en células individualizadas en suspensión y se propagaron por pases seriados.

## 2.2. Adenocarcinoma pancreático ductal

La línea celular CAPAN-2 (ATCC) se cultivó a 37 °C en atmósfera enriquecida con 5 % CO<sub>2</sub> en medio McCoy's 5 A + GlutaMAX (Gibco, ThermoFisher) enriquecido con FBS al 10 %.

## 2.3. Otras líneas celulares

Las líneas celulares que se utilizaron como controles, SK-mel-13 positivo y MCF7 negativo, fueron cultivadas por el Dr. Alberto J. Schuhmacher. La línea celular SK-mel-103 es una línea celular de melanoma que expresa MT1-MMP y fue cedida por el laboratorio de la Dra. María S. Soengas (CNIO) en 2013. La línea celular MCF7 es una línea de cáncer de mama que no expresa MT1-MMP y fue cedida en 2012 por los laboratorios del MSKCC. Ambas se cultivaron a 37 °C en atmósfera enriquecida con 5 % CO<sub>2</sub> en medio de cultivo DMEM a 37 °C con FBS al 10 %.

# 3. Evaluación de la expresión de MT1-MMP en las líneas celulares

## 3.1. Western blot

Los Westerns blot utilizados para evaluar la expresión de MT1-MMP en las diferentes líneas celulares se llevaron a cabo por el Dr. Jorge L. Martínez-Torrecuadrada.

Las células se lisaron en un tampón de lisis (0,5 % NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7,5], 50 mM NaCl, 1x coctel de inhibidor de fosfatasa set II (Calbiochem) y un coctel de inhibidor de proteasas set III EDTA-free (Calbiochem)). A continuación, se cuantificaron las proteínas presentes en el lisado utilizando el ensayo de BCA (Pierce). Los lisados de proteínas se separaron mediante SDS-PAGE (se cargaron 100 µg de proteína por carril) y, a continuación, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham). Las membranas se incubaron con LEM 2/15 frente a MT1-MMP, detectándose utilizando anticuerpos secundarios antirratón conjugados con la enzima peroxidasa del rábano (HRP, Dako) que cataliza una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham).

## 3.2. Citometría de flujo

La evaluación de la expresión de MT1-MMP de las diferentes líneas celulares también se realizó mediante citometría de flujo en los laboratorios del CNIO (Dr. Alberto J. Schuhmacher).

Las células se levantaron de las placas de cultivo utilizando PBS de disociación celular, libre de enzimas (Life Technologies). Tras su contaje, las células se resuspendieron en PBS con 1 % de albúmina de suero bovino (BSA) y sin IgG (tampón FACS, Sigma) y se incubaron con 1 µl de solución de bloqueo de Fc (Becton Dickinson) por cada millón de células durante al menos 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, las células se tiñeron con el anticuerpo

LEM 2/15 durante 15 minutos a 4 °C y se lavaron dos veces con tampón FACS. A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo secundario apropiado conjugado con un fluoróforo (Molecular Probes, Invitrogen), a una dilución 1:500 durante 15 minutos a 4 °C. Tras dos lavados con tampón FACS, las células se resuspendieron en tampón FACS con DAPI (5 mg/ml diluido 1:5.000) para diferenciar las células vivas de las muertas. Las muestras se estudiaron en un citómetro BD LSR II (Becton Dickinson), utilizándose para su análisis el *software* FlowJo (TreeStar).

## 4. Radioquímica

Los procedimientos de conjugación con DFO y marcaje con <sup>89</sup>Zr de los anticuerpos estudiados son una adaptación del trabajo de Maria Vosjan *et al.*<sup>27</sup>.

### 4.1. Conjugación con DFO

Una solución con 2 mg de LEM 2/15 o IgG inespecífica se pipeteó en un tubo eppendorf de baja unión a proteínas (Eppendorf). El volumen de la solución se enrasó hasta 1 ml añadiendo suero salino (B.Braun). El pH de la solución se ajustó entre 8,9-9,1 con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M (Riedel-de Haën).

La DFO-Bz-NCS (DFO, Macrocyclics, Dallas, TX) se disolvió en DMSO (Sigma) a una concentración de 3,5 mM. La disolución de DFO-DMSO se añadió a la solución con el anticuerpo en una relación 5:1 y se mezcló. Es importante que esto se haga en pasos para evitar altas concentraciones locales de DMSO y que se mantenga la concentración de este por debajo del 2 % del volumen de la mezcla de conjugación. En este caso, se añadieron 4 veces 5 µl (20 µl). Por último, la mezcla de conjugación se incubó durante 40 minutos a 37 °C en un baño de agua giratorio G76D (New Brunswick Scientific) a 220 rpm.

Una columna de cromatografía de exclusión molecular PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) se equilibró con 20 ml de ácido gentísico 5 mg/ml (Aldrich Chemistry) en un tampón acetato de sodio 0,25 M (Sigma-Aldrich) a un pH entre 5,4-5,6.

Una vez terminada la incubación, la mezcla de la conjugación se pasó por la columna PD-10 y se descartó el volumen del líquido eluido. Después, se pipetearon 1,5 ml de la disolución de ácido gentísico 5 mg/ml en tampón de acetato de sodio 0,25 M en la columna PD-10 y se descartó el volumen de líquido eluido. Por último, 2 ml de la disolución de ácido gentísico 5 mg/ml en tampón de acetato de sodio 0,25 M se pipetearon en la columna PD-10 y se recogió esta fracción como la que contenía el anticuerpo conjugado con DFO purificado.

Finalmente, el conjugado se guardó a 4 °C para su marcaje al día siguiente. Si se usara días más tarde es recomendable que se guarde a -20 °C, durante un periodo máximo de hasta 2 semanas.



## 4.2. Marcaje con $^{89}\text{Zr}$

Entre 37-74 MBq de la solución comercial de oxalato de  $^{89}\text{Zr}$  (BV Cyclotron VU, Amsterdam, Netherlands) se pipetearon en un vial de reacción. A continuación, se enrasó hasta un volumen de 200  $\mu\text{l}$  con ácido oxálico 1 M (Sigma-Aldrich). Después, 90  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 M se añadieron en el vial de reacción y se esperaron 3 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, 1 ml de HEPES 0,5 M (Sigma) se pipeteó en el vial de reacción. Por último, se añadieron 0,71 ml del anticuerpo conjugado purificado (0,7 mg aproximadamente). Una vez realizada la mezcla de marcaje, se cogieron 2  $\mu\text{l}$  y se comprobó con una tira de papel tornasol (Merck) que su pH se encontraba entre 6,8-7,2. Una vez verificado esto, la mezcla de marcaje se incubó durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente en agitación constante.

Una vez pasado el tiempo de incubación, la mezcla de reacción se pipeteó en la columna PD-10, equilibrada con 20 ml de PBS (Sigma), y el volumen del líquido eluido se descartó. Posteriormente, se fue añadiendo PBS a la columna (en volúmenes de 250  $\mu\text{l}$ ) recolectándose en fracciones que fueron analizadas en un activímetro VDC-405 (Veenstra instruments). Finalmente, aquellas fracciones que contenían el anticuerpo marcado se juntaron (tubos entre las fracciones 5-15) y se prepararon las jeringas con las dosis de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG necesarias para su inoculación en los animales que se utilizarían en los experimentos de biodistribución *ex vivo* e imagen.

## 4.3. Caracterización del anticuerpo (control de calidad)

### 4.3.1. Número de quelantes por anticuerpo

Este procedimiento es una versión adaptada del método directo del libro *Clinical Translation of Radiolabeled Monoclonal Antibodies and Peptides*<sup>226</sup>. Para ello, se tomó una alícuota (140  $\mu\text{l}$ ) de la mezcla de conjugación (punto 4.1), en la cual coexisten DFO, DFO-mAb y anticuerpo no conjugado, y se marcó con  $^{89}\text{Zr}$  de acuerdo con lo referido en el punto 4.2. Una vez realizado el marcaje, la mezcla se pasó por una columna PD10 con el fin de separar la radiactividad correspondiente a la DFO unida al anticuerpo ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15) y a la libre ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO). Dado que la relación inicial DFO:mAb es 5:1, el número de quelantes por anticuerpo se puede calcular a partir del porcentaje de radionúclido incorporado al anticuerpo de acuerdo a la siguiente expresión:

$$n.^{\circ} \text{ quelantes por mAb} = \frac{n.^{\circ} \text{ máximo de quelantes por mAb} \times \text{porcentaje de mAb marcado}}{100}$$

### 4.3.2. Pureza radioquímica

Para medir la pureza radioquímica se utilizaron tiras de cromatografía en capa fina instantánea o ITLC (Biodex). Estas tiras tienen tres líneas diferentes: una línea inferior en la que se deposita la muestra origen, una línea media que separa la zona de migración de la muestra marcada (sección 1) y correspondiente al radioisótopo libre (sección 2), y una línea superior que se corresponde con el frente del solvente (figura 12). La fase móvil se preparó añadiendo 450  $\mu\text{l}$  de ácido cítrico (Merck) 20 mM y 50  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo (Rathburn Chemicals Ltd) en un tubo de ensayo. Se pipetearon 1-2  $\mu\text{l}$  de la mezcla de marcaje purificada sobre la tira de ITLC. Esta se colocó en posición vertical en el interior de un tubo de ensayo que contenía los 500  $\mu\text{l}$  de fase móvil y tras un minuto, cuando la fase móvil alcanzó

la línea del frente del solvente, la tira se extrajo del tubo de ensayo. Por último, se cortó en las dos secciones que recomienda el fabricante y se introdujeron en un tubo de ensayo cada una. Los tubos se midieron en un contador gamma (2470 Wizard<sup>2</sup>, PerkinElmer). Para el cálculo de la pureza radioquímica (%) se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Pureza radioquímica} = \left( \frac{\text{cpm section 1}}{\text{cpm (sección 1 + sección 2)}} \right) \times 100$$



**Figura 12.** Tira de cromatografía en capa fina instantánea de Biodex. La línea de origen, la línea separación de la sección 1 (muestra marcada) y 2 (radionúclido libre) y la línea del frente del solvente, de abajo arriba. La zona verde es un colorante que migra a la vez que el frente de la fase móvil para indicar que está cerca del final de la tira.

#### 4.3.3. Estabilidad *in vitro*

La estabilidad *in vitro* se estudió en suero sanguíneo humano y en plasma sanguíneo humano. Para la extracción de suero sanguíneo humano se utilizó un tubo de extracción de sangre con gel (BD Vacutainer) y para la de plasma sanguíneo se utilizó un tubo de extracción con citrato al 3,2 % (Greiner bio-one). Las muestras se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, se alicuotaron en 90 µl y se guardaron a -20 °C.

Al comienzo de los estudios de estabilidad, las alícuotas se descongelaron y se añadieron 10 µl de mAb recién marcado. Las muestras de suero y plasma con el mAb marcado permanecieron a 4 °C o 37 °C durante todo el estudio. Al inicio (tiempo 0) y a 1, 2 y 7 días se realizó un análisis de la pureza radioquímica con el protocolo descrito en el apartado anterior (4.3.2).

#### 4.3.4. Inmunoreactividad

El estudio de la inmunoreactividad se realizó por el Dr. Alberto J. Schuhmacher a través de citometría de flujo con la línea celular U251. El procedimiento fue el mismo que en el apartado 3.2 salvo que en la incubación con el anticuerpo primario se utilizó LEM 2/15 de tres maneras diferentes: LEM 2/15, DFO-LEM 2/15 y <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15.

## 5. Modelos tumorales subcutáneos y ortotópicos en roedores

Los modelos tumorales de GBM se desarrollaron por el Dr. Alberto J. Schuhmacher. Los modelos tumorales basados en las células CAPAN-2 se realizaron en la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinéticas del CIEMAT, mientras que los modelos tumorales derivados de pacientes (PDX) de PDAC se realizaron por el Dr. Pedro P. López-Casas de la Unidad de Investigación Clínica de Tumores Digestivos del CNIO. Todos los modelos animales se realizaron en ratones atímicos desnudos (Nude-Foxn1nu, Harlan Laboratories) de aproximadamente 6-8 semanas de edad, a excepción del modelo de metástasis de PDAC que se realizó en ratones NOD Scid Gamma (NGS).

Todos los experimentos animales se realizaron acorde a los protocolos aprobados por el Comité de Ética de la Investigación y Bienestar Animal (CEIyBA) del CNIO-ISCIII, así como del CIEMAT y bajo las directrices declaradas en los principios rectores internacionales para animales involucrados en la investigación biomédica, desarrollados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). Los animales se sacrificaron cuando los experimentos lo requirieron o en las siguientes situaciones: cuando la masa del tumor alcanzó un tamaño superior a 1500 mm<sup>3</sup>, se observó ulceración en la piel debida al tumor o los ratones presentaban una sintomatología relacionada con el desarrollo del tumor como letargia, pobre acicalamiento, pérdida de peso o encorvamiento.

### 5.1. Glioblastoma multiforme

#### Xenografts heterotópicos subcutáneos:

- **Grupo 1:** un volumen de 200 µl que contenía  $7,5 \times 10^5$  células U251 o  $1 \times 10^6$  células MCF7 en una mezcla de DMEM (Sigma):Matrigel (BD Biosciences) (1:1) se inoculó subcutáneamente en los flancos posteriores, derecho e izquierdo respectivamente, de los ratones. Una vez que los tumores fueron palpables, los animales fueron aptos para realizar los estudios por biodistribución *ex vivo* e inmunoPET.
- **Grupo 2:** un volumen de 200 µl que contenía  $7,5 \times 10^5$  células U251 en una mezcla de DMEM:Matrigel (1:1) se inoculó subcutáneamente en ambos flancos posteriores de los ratones. Una vez que los tumores fueron palpables, los animales fueron aptos para realizar los estudios por inmunoPET.
- **Grupo 3:** un volumen de 200 µl que contenía  $1 \times 10^5$  células TS543 en una mezcla de DMEM:Matrigel (1:1) se inoculó subcutáneamente en los flancos posteriores de los ratones. Una vez que los tumores fueron palpables, los animales fueron aptos para realizar los estudios por inmunoPET.

#### Xenograft ortotópicos:

- **Grupo 4:** células U251 transfectadas con el plásmido reportero TGL (TK-Luciferasa-GFP), para monitorizar el crecimiento del tumor por bioluminiscencia, se inocularon intracranalmente a los animales<sup>227</sup>. Para el desarrollo de este modelo animal, a los ratones se les anestesió con 10 mg/ml de ketamina y 1 mg/ml de xilacina; posteriormente, se inyectó subcutáneamente 50 µl de anestésico local bupivacaína 0,25 % en la zona de incisión y cirugía. Finalmente, una suspensión de 1,5 µl de  $2,5 \times 10^5$  de células U251-TGL (resuspendidas en PBS) se inyectó intracranalmente, con la ayuda de un aparato

de cirugía estereotáctica (Stoelting), en ratones de 6 semanas de edad. Las inyecciones se realizaron en la corteza frontal derecha, zona subventricular, empleando las siguientes coordenadas: aproximadamente 1 mm caudal y 1,5 mm lateral desde el bregma, y a una profundidad de 2 mm utilizando una jeringuilla Hamilton (Hamilton) como se describió previamente<sup>228</sup>.

- **Grupo 5:** células TS543 transfectadas con el plásmido reportero TGL se inocularon intracranalmente a los animales. Estas neuroesferas han sido previamente empleadas en estudios de imagen PET e implantadas intracranalmente<sup>229</sup>. Para el desarrollo de este modelo animal se procedió exactamente como en el caso anterior, pero inoculando 1,5  $\mu$ l de  $5 \times 10^4$  de células TS543-TGL (resuspendidas en PBS) intracranalmente, con la ayuda de un aparato de cirugía estereotáctica, en ratones de 6 semanas de edad.

El crecimiento de los tumores de ambos modelos se monitorizó tras la inyección de Luciferina-D (150 mg/kg) en un equipo IVIS200 (PerkinElmer); las imágenes se adquirieron durante 5 segundos. El análisis de bioluminiscencia se realizó utilizando el *software* Living Image, versión 2.50. Cuando los tumores se encontraron en fase de crecimiento se realizaron los experimentos de inmunoPET.

## 5.2. Adenocarcinoma pancreático ductal

### Xenograft heterotópicos subcutáneos:

- **Grupo 6:** un volumen de 200  $\mu$ l de PBS que contenía  $1,5 \times 10^6$  células CAPAN-2 se inoculó subcutáneamente en los flancos anteriores de ratones de 6 semanas de edad. Una vez que los tumores fueron palpables, los animales fueron aptos para realizar los estudios por inmunoPET.

### Xenografts ortotópicos:

- **Grupo 7:** una muestra de un PDAC procedente de un paciente (muestra PANC 198 perteneciente a la colección de modelos del Dr. Manuel Hidalgo, CNIO) se utilizó para generar un modelo murino de PDX. Estos xenoinjertos conservan las características biológicas del tumor original y su heterogeneidad celular, aspecto muy importante dada la complejidad biológica del PDAC. Para ello, el material del xenoinjerto se expandió y se implantó ortotópicamente en ratones.
- **Grupo 8:** el xenoinjerto de PDAC (muestra PANC 198) se realizó también en ratones NGS mediante el mismo procedimiento anterior (grupo 7). A diferencia de los ratones *nude*, en los ratones NGS el tumor puede diseminarse a órganos distantes. Esto lo hace un modelo muy interesante para estudiar el diagnóstico de metástasis de cáncer de páncreas por imagen.

## 6. Estudios de biodistribución *ex vivo* y microPET/CT

### 6.1. Grupos experimentales

En el estudio de biodistribución *ex vivo* e imagen microPET/CT se utilizaron los mismos grupos que en el apartado anterior:

- Para los estudios de GBM

Los experimentos de xenograft heterotópicos subcutáneos se realizaron de la siguiente manera:

**Grupo 1:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (1,5 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ) se inyectó a ratones ( $n = 14$ ) portadores de células MCF7 (no expresan MT1-MMP) en un flanco y de células U251 en el otro flanco (expresa MT1-MMP). La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Los animales fueron sacrificándose a 1, 2, 4 y 7 días posinyección y, además, la mayoría fueron analizados en un escáner microPET/CT durante el periodo de estudio. Los animales, previo al sacrificio, se anestesiaron con un 2 % de isoflurano en  $\text{O}_2$ , y seguidamente se procedió a su exanguinación por punción cardíaca con una jeringuilla heparinizada y eutización mediante dislocación cervical. Inmediatamente después, los ratones fueron diseccionados, obteniéndose corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estómago, grasa, músculo, fémur derecho y una muestra de intestino delgado; los tejidos se pesaron y su radiactividad se midió en el contador gamma. La actividad en los diferentes tejidos se expresó como el porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% ID/g). Finalmente, los tumores fueron fijados en formalina y guardados a 4 °C para su posterior análisis por inmunohistoquímica.

**Grupo 2:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (3,5 MBq, 65  $\mu\text{g}$ ,  $n = 6$ ) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG (0,5 MBq, 65  $\mu\text{g}$ ,  $n = 4$ ) se inyectaron a ratones portadores de células U251 en ambos flancos. La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través del seno venoso retro-orbital. Se ha comprobado que este método tiene una efectividad similar a la inyección intravenosa a través de la vena lateral de la cola<sup>230</sup>. Las imágenes se adquirieron a los 1, 3, 6 y 8 días posinyección. Finalmente, los tumores fueron fijados en formalina y guardados a 4 °C para su posterior análisis por inmunohistoquímica.

**Grupo 3:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (3,5 MBq, 65  $\mu\text{g}$ ,  $n = 6$ ) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG (0,5 MBq, 65  $\mu\text{g}$ ,  $n = 3$ ) se inyectaron a ratones portadores de células TS543 en ambos flancos. La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través del seno venoso retro-orbital. Las imágenes se adquirieron a los 1, 3 y 6 días posinyección.

Los experimentos de modelos ortotópicos se realizaron de la siguiente manera:

**Grupo 4:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (1,5 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ,  $n = 5$ ) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG (0,74 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ,  $n = 5$ ) se inyectaron a ratones portadores de células U251-TGL en el cerebro. La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Las imágenes se adquirieron a los 2 y 4 días posinyección.

**Grupo 5:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (1,5 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ,  $n = 5$ ) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG (0,74 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ,  $n = 3$ ) se inyectaron a ratones portadores de células TS543-TGL en el cerebro. La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Las imágenes se adquirieron a los 2 y 4 días posinyección. Algunos

ratones fueron eutanizados por dislocación cervical a los 2 días. Después, se les extrajo el cerebro para incluirlo en OCT (Tissue-Tek, USA) y se congeló a -80 °C hasta su posterior análisis por autoradiografía, histología e inmunohistoquímica.

- Para los estudios de PDAC

Los experimentos de xenograft heterotópicos subcutáneos se realizaron de la siguiente manera:

**Grupo 6:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (1,4 MBq, 20  $\mu\text{g}$ , n = 6) se inyectó a ratones portadores de células CAPAN-2 en ambos flancos. En dos de los animales se inyectó 1 mg de LEM 2/15 una hora antes de la administración del radiotrazador. La inyección de ambos se realizó por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Las imágenes se tomaron a los 1, 3, 5 y 7 días posinyección, y al finalizar el estudio microPET/CT el día 7, los ratones fueron sacrificados. Los animales, previo al sacrificio, se anestesiaron con un 2 % de isoflurano en  $\text{O}_2$ , y seguidamente se procedió a su exanguinación por punción cardíaca con una jeringuilla heparinizada y eutanización mediante dislocación cervical. Inmediatamente después, los ratones fueron diseccionados, obteniéndose corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estómago, páncreas, grasa, músculo, fémur derecho y una muestra de intestino delgado; los tejidos se pesaron y su radiactividad se midió en el contador gamma. La actividad en los diferentes tejidos se expresó como % ID/g. Finalmente, los tumores fueron fijados en formalina y guardados a 4 °C para su posterior análisis por inmunohistoquímica.

Los experimentos de modelos ortotópicos se realizaron de la siguiente manera:

**Grupo 7:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (1,06 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ) se inyectó a un modelo de ratón PDX (n = 4) y a ratones control sin tumores (n = 2). La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Las imágenes se tomaron a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección, y al finalizar el estudio microPET/CT el día 7, los ratones fueron sacrificados. Los animales, previo al sacrificio, se anestesiaron con un 2 % de isoflurano en  $\text{O}_2$ , y seguidamente se procedió a su exanguinación por punción cardíaca con una jeringuilla heparinizada y eutanización mediante dislocación cervical. Inmediatamente después, los ratones fueron diseccionados, obteniéndose corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, estómago, páncreas, grasa, músculo, fémur derecho y una muestra de intestino delgado; los tejidos se pesaron y su radiactividad se midió en el contador gamma. La actividad en los diferentes tejidos se expresó como % ID/g. Finalmente, los tumores fueron fijados en formalina y guardados a 4 °C para su posterior análisis por inmunohistoquímica.

**Grupo 8:**  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (1,12 MBq, 20  $\mu\text{g}$ ) se inyectó a un modelo metastásico de ratón NGS PDX (n = 3) y a ratones NGS control sin tumores (n = 2). La inyección del radiotrazador se realizó por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola. Las imágenes se tomaron a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección. Al finalizar el estudio microPET/CT el día 7, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se les extrajeron los pulmones, el hígado y el páncreas. Finalmente, estos órganos fueron fijados en formalina y guardados a 4 °C para su posterior análisis por inmunohistoquímica.

## 6.2. Análisis de radiactividad mediante contador gamma

En los estudios de biodistribución *ex vivo*, la actividad en las muestras se determinó en el contador gamma. Este proporciona las cpm (cuentas por minuto) de la muestra a determinar; la actividad real (dpm, desintegraciones por minuto) se calcula dividiendo este valor por la eficiencia de conteo expresada en tanto por uno. La eficiencia del contador para el radionúclido  $^{89}\text{Zr}$  se calculó utilizando un patrón de referencia de actividad conocida (expresada en desintegraciones por minuto, dpm) elaborado en el Laboratorio de Metrología de Radiaciones Ionizantes del CIEMAT. La eficiencia se determinó mediante la siguiente expresión:

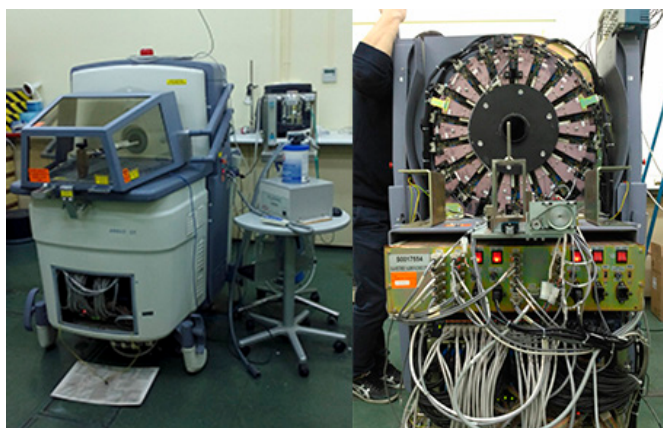
$$\text{Eficiencia} = \frac{cpm_m}{dpm_p}$$

siendo  $cpm_m$  el número de cuentas por minuto de la muestra patrón medido en el contador gamma y  $dpm_p$  el número de desintegraciones por minuto teórico de la muestra patrón.

La actividad radiactiva se expresó en la unidad del Sistema Internacional, el becquerelio (Bq), o en múltiplos de este, sabiendo que 1 Bq equivale a 60 dpm.

## 6.3. Equipo microPET/CT

Un equipo Argus microPET/CT (figura 13), comercializado por SEDECAL (Madrid), se utilizó como escáner para el análisis de los animales mediante imagen molecular. Este escáner preclínico integra varios detectores microPET junto con un sistema de imagen CT proporcionando una imagen multimodal microPET/CT en un mismo estudio. El equipo microPET se compone de 36 módulos detectores organizados en dos anillos de 11,8 cm de diámetro. Los módulos constan de una matriz de  $13 \times 13$  elementos con 15 mm de profundidad. Cada uno de ellos contiene un cristal  $\text{LYSO:Ce}$  de 7 mm junto con uno  $\text{GSO:Ce}$  de 8 mm de profundidad; dicha separación en dos capas de detección es característica de la tecnología phoswich. El cristal de GSO forma una capa exterior de detectores que se adhiere ópticamente a los PMT multicanal Mamamatsu R8520-00-C12. El Argus microPET adquiere eventos en coincidencia 3D usando un sistema de adquisición basado en módulos ADC de integración de carga y a un controlador lógico propio; todo ello se conecta al procesador principal de señal usando una comunicación Ethernet de alta velocidad. En la tabla 3 se pueden observar algunas de las principales características de este equipo.



**Figura 13.** Equipo Argus microPET/CT en el Laboratorio de Imagen Molecular de la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética del CIEMAT, a la izquierda, el equipo operativo y, a la derecha, el equipo abierto donde pueden observarse los detectores de centelleo.

**Tabla 3.** Características del sistema microPET del equipo Argus microPET/CT

<b>Detectores</b>	
Diámetro del anillo	11,8 cm
Número de detectores	36
Tipo de PMT	Hamamatsu R8520-C12
<b>Cristales del detector</b>	
Capa de cristales (dirección radial)	2
Tamaño de cristal-capa exterior	1,45 × 1,45 × 7 (mm <sup>3</sup> )
-capa interior	1,45 × 1,45 × 8 (mm <sup>3</sup> )
Distancia entre cristales (centro a centro)	1,55 mm
cristal centellador-capa exterior	LYSO:Ce
-capa interior	GSO:Ce
Volumen del cristal centellador	383,75 cm <sup>3</sup>
Número de cristales	12 168
<b>Sistema</b>	
FOV efectivo transversal	6 cm
FOV axial	4,6 cm
Detectores rotativos	No
Ventana de coincidencia	6,5 ns
Ventanas de energía (KeV)	100-700
	250-700
	400-700
Tamaño de pixel de la imagen	0,387 mm
Distancia entre planos transaxiales	0,77 mm

Extraído de Cañadas M. (2012).

El equipo CT utiliza la tecnología CMOS de paneles planos con una placa centelladora de CsI microcolumnar y una fuente de rayos X microfoco. En la tabla 4 se puede observar algunas de las principales características del CT.



**Tabla 4.** Características del sistema CT del equipo Argus PET/CT

<b>Detector</b>	
Área del detector	120 × 120 mm
Tamaño del pixel	50, 100, 200 µm
Cristal centellador	CsI
<b>Fuente de rayos X</b>	
Punto focal	35 µm
Pico de energía	0-50 Kv (variable)
Corriente máxima	1 mA
Potencia máxima	50 vatios (continua)
<b>Sistema</b>	
FOV	68 × 68 mm

Extraído de SEDECAL (2009).

El *software* comercial (MMWKS) del equipo incluye algoritmos iterativos (OSEM) y analíticos (FBP) para la reconstrucción de imagen (tabla 5), alcanzando una resolución de 1-1,5 mm en condiciones óptimas. Además, tiene la posibilidad de realizar una compresión axial de los datos (algoritmo de rebinning FORE) para posteriormente reconstruir la imagen plano a plano. También incluye métodos de corrección comunes a la técnica PET como la corrección del decaimiento radiactivo, la corrección de la atenuación, *scatter* y de las *randoms*. Este *software* también contiene herramientas de visualización, segmentación y cuantificación de imágenes.

**Tabla 5.** Características de los algoritmos de reconstrucción del equipo Argus PET/CT

<b>Algoritmos de reconstrucción</b>	
Resolución espacial central-FBP	1,3 mm
-2DOSEM	1,1 mm
-3DOSEM	1 mm
Tiempo de reconstrucción-FBP	≤ 5 s
-2DOSEM	≤ 1 min
-3DOSEM	≤ 5 min

Extraído de SEDECAL (2009).

### 6.3.1. Adquisición de imagen

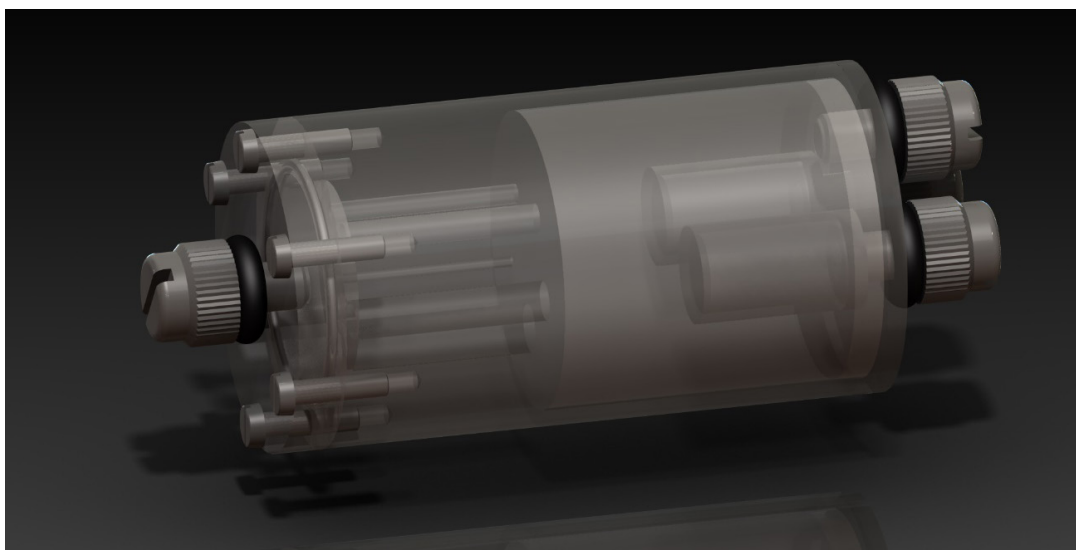
La elección de la ventana de energía se realizó en función de la actividad inyectada, para bajas actividades 250-700 KeV mientras que para altas actividades 400-700 KeV. El tiempo de adquisición en todos los animales fue de 30 minutos en modo estático.

En todos los estudios con animales, antes o después de la adquisición por microPET, se realizó un CT con un voltaje de 45 kV, una corriente de 150  $\mu$ A, 8 disparos, 360 proyecciones y resolución estándar.

### 6.3.2. Reconstrucción y análisis de imagen

Las imágenes se reconstruyeron mediante el algoritmo 2D-OSEM con 16 subsets y 2 iteraciones. Además, se les aplicaron las correcciones de *randoms* y *scatter*.

La concentración radiactiva en una determinada región de interés (ROI) en una imagen viene expresada en unidades de imagen (cps/ml). Su conversión en la unidad del Sistema Internacional requiere obtener una imagen, reconstruida en las mismas condiciones, de un maniquí con una concentración radiactiva conocida, tal como el que se describe en el protocolo NEMA NU-4 2008<sup>231</sup>. Este maniquí está construido con polimetilmetacrilato con una longitud de 50 mm y un diámetro de 30 mm. Asimismo, está dividido en tres partes: una región homogénea central y dos regiones laterales. La región central está formada por una cámara de 30 mm de diámetro  $\times$  30 mm de longitud, y se comunica con los cinco cilindros de 1, 2, 3, 4 y 5 mm de diámetro taladrados en los 20 mm que representa una de las regiones laterales. La otra región lateral es una continuación de la región central que contiene dos cámaras frías formadas por dos cilindros huecos de 15 mm de longitud y 8 mm de diámetro interno (10 mm de diámetro externo). Además de la conversión de las unidades de imagen, los parámetros de calidad de imagen que se pueden evaluar en este maniquí son los coeficientes de recuperación, el coeficiente de variación (medida del ruido) y la ratio del *spillover* en agua y aire (medida de la concentración de la actividad en regiones no radiactivas relativas a la concentración media de la región radiactiva homogénea). La figura 14 representa una reconstrucción 3D del maniquí aquí descrito.



**Figura 14.** Maniquí de calidad de imagen del protocolo NEMA NU-4 2008. Fuente: web de Detection And Radiation Technologies, SL.

El área homogénea del maniquí se utilizó para transformar las unidades de imagen en unidades de actividad radiactiva utilizando un factor de calibración o Scaling Factor (SF). El maniquí se relleno con  $^{89}\text{Zr}$  disuelto en una solución de DTPA 50 mM para evitar que se adhiriera a sus paredes. El análisis de la imagen en MMWKS se realizó dibujando un volumen de interés (VOI) de 22,5 mm de diámetro (75 % del diámetro activo) y 10 mm de longitud en el centro de la zona uniforme. Una vez determinada la concentración radiactiva en el VOI del maniquí (expresada en cps/ml) y conociendo su concentración radiactiva (expresada en Bq/ml) medida mediante el activímetro, se estimó el valor del SF mediante la siguiente expresión:

$$SF \text{ (Bq/cps)} = \frac{\text{Bq/ml}}{\text{cps/ml}}$$

Una vez calculado el SF para el  $^{89}\text{Zr}$ , este se introdujo en la interfaz de reconstrucción de imagen de MMWKS junto con la dosis inyectada en el momento de inicio de la adquisición, y expresada en MBq, así como el peso del animal, expresado en gramos (figura 15). De esta forma, la cuantificación de la concentración radiactiva en una ROI ya vendrá expresada en Bq/ml.

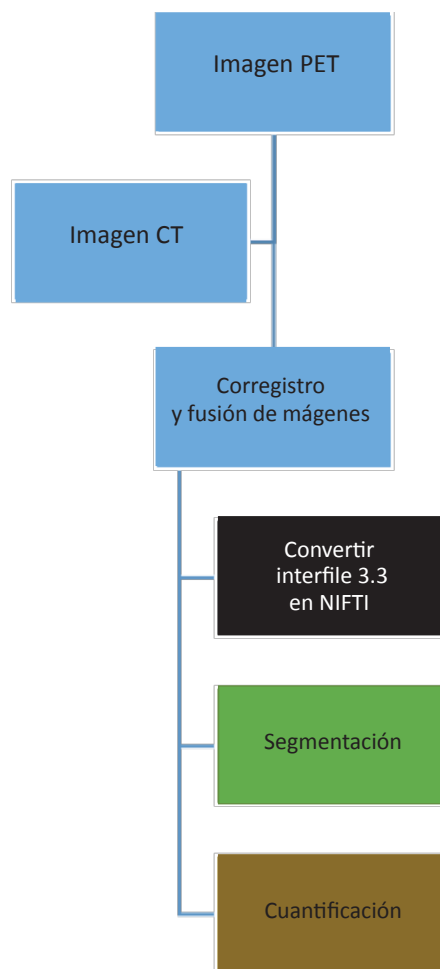
**Figura 15.** Interfaz de reconstrucción del *software* comercial del microPET/CT Argus. Para trabajar con parámetros cuantitativos hay que introducir la dosis inyectada en el momento inicial del PET, el SF y el peso del animal. Además, se puede realizar correcciones como *random*, *scatter* o atenuación.

El parámetro cuantitativo más utilizado a la hora de cuantificar la captación de un radiotrazador en cualquier tipo de tejido es el Valor de Captación Estándar o Standard Uptake Value (SUV). El SUV determinado en una ROI en la imagen es la relación entre la concentración de radiactividad en la ROI y la dosis inyectada al sujeto de estudio normalizada por el peso del animal, es decir:

$$SUV = \frac{\text{Actividad media del ROI (MBq/ml)}}{\frac{\text{Dosis inyectada (MBq)}}{\text{Peso del sujeto de estudio (g)}}}$$

En caso de que se utilizara un valor de 100 para el peso del sujeto de estudio, el valor del SUV obtenido sería el % ID/g, al asumir la densidad de los tejidos como 1 g/ml.

En el diagrama de flujo de trabajo de la figura 16 se puede ver el orden en el cual se han manipulado las imágenes y los diversos programas utilizados. Una vez reconstruidas las imágenes microPET y transformadas las unidades de imagen en SUV o % ID/g, se coregistraron con las imágenes CT por MMWKS (azul). Después, el *software* libre AMIDE (negro) se utilizó para cambiar el formato de salida del *software* comercial del equipo, interfile 3.3, en NIFTI<sup>232</sup>. Estos archivos se cargaron en el *software* libre de segmentación de imagen ITK-Snap (verde) donde se utilizaron las herramientas manuales y semiautomáticas de segmentación<sup>233</sup>. Finalmente, los datos cuantitativos se extrajeron a través de la herramienta de línea de comandos Convert3D (marrón). Además, las imágenes presentadas en esta tesis se prepararon mediante AMIDE.



**Figura 16.** Diagrama de flujo de trabajo de las imágenes obtenidas por el microPET/CT Argus. En azul están los procedimientos llevados a cabo con el programa comercial MMWKS, en negro los llevados a cabo por AMIDE, en verde los llevados a cabo por ITK-Snap y en marrón los llevados a cabo con 3DConvert.

#### 6.4. Análisis farmacocinético

El estudio de los parámetros farmacocinéticos de LEM 2/15 se realizó con un modelo no compartimental, en vez de uno bicompartimental (modelo cinético habitual de los anticuerpos), a través del *software* libre PKSolver<sup>234</sup>. Este tipo de modelización fue usada debido a la falta de un número suficiente de puntos experimentales en la fase inicial posinyección, lo que imposibilitaba el ajuste de los datos a un modelo biocompartimental. El modelo no compartimental tiene algunas ventajas como que no necesita disponer de un modelo cinético concreto, la

posibilidad de extraer parámetros que explican los datos experimentales e incluso predecir los niveles de fármaco tras dosis múltiples del mismo<sup>235</sup>.

Los modelos no compartimentales se basan en la disposición del fármaco en la fase terminal de la curva de los niveles plasmáticos, sin necesidad de establecer ningún tipo de interrelación entre el fármaco y el sustrato biológico sobre el que se encuentra. En este tipo de modelo se asume que el proceso de eliminación es de primer orden y esto puede comprobarse mediante la regresión lineal simple de los logaritmos de los niveles plasmáticos frente al tiempo, en la fase terminal<sup>236</sup>. Los parámetros farmacocinéticos que se pueden obtener de esta manera son la constante de eliminación ( $K_{el}$ ), la  $t_{1/2}$ , el área bajo la curva (AUC), el tiempo de residencia medio (MRT), el  $Cl_p$  y el volumen de distribución en el estado estacionario ( $V_{ss}$ ). Por último, para calcular estos parámetros en PKsolver se utilizó el método trapezoidal log-lineal.

## 7. Integridad de la barrera hematoencefálica en el modelo de GBM

El estudio de integridad de la barrera hematoencefálica fue realizado en el CNIO por el Dr. Alberto J. Schuhmacher, utilizando los procedimientos descritos por Manaenko *et al.*<sup>237</sup>. Las células U251-TGL y TS543-TGL se inyectaron en ratones de 6-8 semanas de edad utilizando un aparato de cirugía estereotáctica, monitorizando el desarrollo del tumor cerebral por bioluminiscencia como se ha descrito previamente (apartado 5.1). Como controles en este estudio se utilizaron ratones en los que se simuló la operación de inoculación de células intracraneal inyectándoles 1,5  $\mu$ l de PBS y animales que no habían sufrido ningún tipo de manipulación.

El estado de la barrera hematoencefálica se evaluó tras la inyección intraperitoneal de 800  $\mu$ l de tinción azul de Evans al 2 % (Sigma). Una hora después de la inyección, los ratones fueron anestesiados y perfundidos con fijador acidificado (PFA al 1 % en *buffer* citrato 0,05 mM, pH 3,5). El tejido cerebral (30 mg) se incubó en 500  $\mu$ l de formaldehído (Sigma) para extraer el azul de Evans a 60 °C durante la noche. La absorbancia a 610 nm y 710 nm se midió en un lector de placas (Sinergy 4, BioTek Instruments, USA), indicativa de la presencia de azul de Evans en el cerebro y, por tanto, de la disrupción de la barrera hematoencefálica.

## 8. Autorradiografía e inmunohistoquímica

Estos estudios fueron realizados por la Dra. Alba de Martino y por la Unidad de Histopatología del CNIO.

### 8.1. Autorradiografía

Los tumores de algunos ratones de los modelos xenograft heterotópicos subcutáneos o todo el cerebro de los animales con tumores ortotópicos, correspondientes ambos con el modelo de GBM y extraídos tras el sacrificio, se incluyeron y congelaron en OCT (Tissue-Tek, USA). Las muestras congeladas se seccionaron en cortes de 30  $\mu$ m de grosor en un criostato (CM 1850, Leica). La autorradiografía (ARG) se obtuvo por exposición de las secciones congeladas con una pantalla de fósforo en un equipo Phosphor Imager STORM (GE Healthcare). Después de la autorradiografía, las muestras congeladas se cortaron en serie a 10  $\mu$ m de grosor y se montaron en portaobjetos, se

descongelaron y se dejaron secar durante 30 minutos. Los cortes fueron fijados en formalina tamponada neutral al 10 % durante 10 minutos. Por último, las secciones fueron teñidas con H&E y analizadas por inmunohistoquímica con LEM 2/15, como se describirá en el apartado 8.2.

## 8.2. Inmunohistoquímica

Los ratones con tumores implantados se sacrificaron después del estudio de inmunoPET y los tumores y órganos correspondientes a cada grupo experimental (páncreas, pulmones e hígados, dependiendo de los grupos a analizar) fueron extraídos en formalina tamponada al 10 % (Sigma) y embebidos en parafina. Para los análisis histopatológicos, los tejidos se seccionaron en 3  $\mu\text{m}$  y se tiñeron por hematoxilina y eosina (H&E). La tinción inmunohistoquímica fue hecha utilizando el anticuerpo LEM 2/15 a una dilución 1:400 después de recuperar el antígeno con un *buffer* de pH bajo en un sistema de preparación de muestras para inmunohistoquímica (Dako) y contrateñido con hematoxilina. Los portaobjetos fueron digitalizados utilizando el escáner Mirax (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania) y se tomaron dibujos con el *software* Pannoramic Viewer (3D Histech Ltd., Ramsey, NJ, USA). Además, este protocolo también se aplicó en muestras de PDAC humanas para determinar cuál era la más adecuada para el xenoinjerto que, posteriormente, se implantaría en los modelos de ratón PDX de tumor primario y de metástasis. Asimismo, para determinar si el modelo de metástasis era apropiado, se visualizó a través de una sonda la secuencia ALU característica de primates en búsqueda de focos metastásicos en varios tejidos.

Para la doble tinción inmunohistoquímica, los cortes se incubaron secuencialmente con los anticuerpos primarios y secundarios apropiados de la siguiente manera: LEM 2/15 (1/400) seguido por un anticuerpo policlonal de conejo CD-31 (1:50, Abcam ab28364) o LEM 2/15 (1:400) seguido por un anticuerpo monoclonal de conejo anti-Ki67 prediluido (clon MIB1, Dako). Después del anticuerpo primario, los cortes se incubaron con el sistema de visualización adecuado a cada caso (OmniRabbit, Ventana; Roche o Cabra anticonejo; Dako) conjugado con la HPR y UltraMap anti-Rb Alk Phos (Ventana; Roche) conjugada con fosfatasa alcalina. Las reacciones inmunohistoquímicas fueron realizadas utilizando diaminobencidina (DAB) como cromógeno (Chromomap DAB; Ventana, Roche) o fosfato de naftol y rojo ultrarápido (Chromomap Red; Ventana, Roche). Por último, el núcleo fue contrateñido con hematoxilina de Carrazi. Los cortes digitales se obtuvieron como se describió previamente.

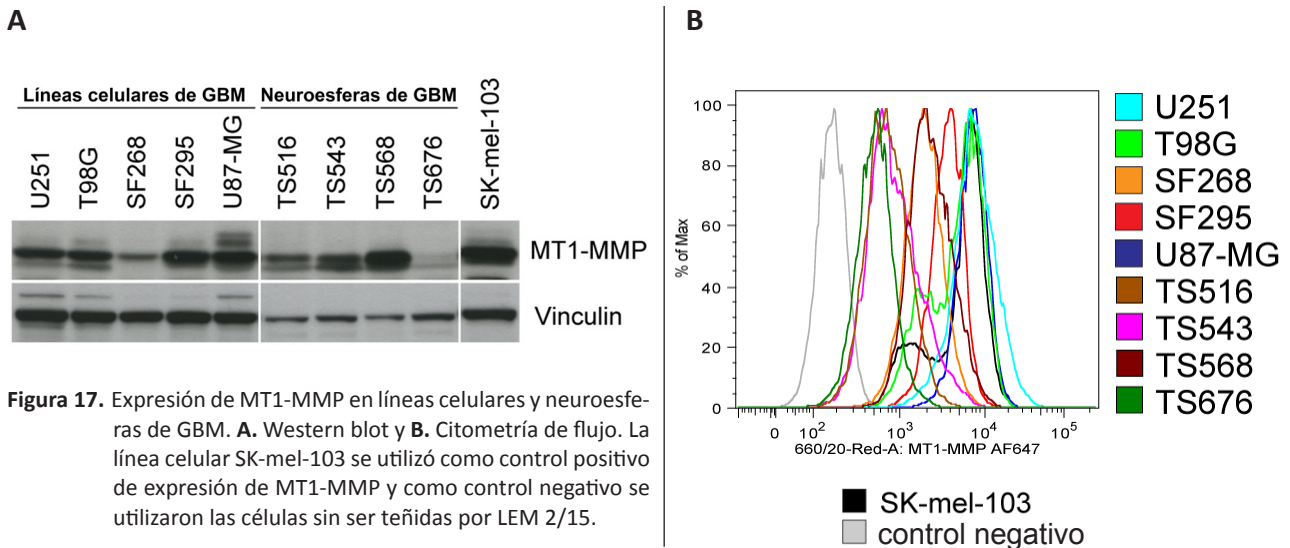
## 9. Análisis estadístico

El *software* libre R (versión 3.2.4 revisada (2016-03-16 r70336)), además de los paquetes “Rcmdr” y “ggplot2”, se utilizaron tanto para el análisis estadístico de los datos como para su representación<sup>238,239</sup>. Los valores medios se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (SD), a excepción de las ratios, los cuales se presentaron como la mediana  $\pm$  rango intercuartílico. La prueba t-Student (t.test) para datos no pareados se utilizó para la comparación de poblaciones; asimismo, para el análisis de las ratios se transformaron los datos mediante logaritmos y se utilizó la prueba t-Student. Un test de ANOVA se utilizó para el estudio estadístico de la captación de anticuerpo marcado en los diferentes tejidos, así como de las ratios, a lo largo del tiempo de duración del experimento en conjunción con el test HSD de Tukey. Un p-valor de 0,05 o menor se consideró como estadísticamente significativo.

# RESULTADOS

## 1. Expresión de MT1-MMP en líneas celulares

La expresión de MT1-MMP se estudió en varias líneas celulares y neuroesferas de GBM mediante Western blot (figura 17 A) y citometría de flujo (figura 17 B). En cuanto a las líneas celulares de GBM, excepto la SF268, todas mostraron una alta expresión de MT1-MMP; la línea U251, a pesar de no ser la línea con mayor expresión, se seleccionó por tener una mayor capacidad de infiltración en el tejido cerebral<sup>222</sup>. Respecto a las neuroesferas, se seleccionó TS543, a pesar de no ser la línea que expresaba más MT1-MMP, por su rápido crecimiento en los modelos animales y también por su capacidad de infiltración en el tejido cerebral.



La expresión de MT1-MMP también fue evaluada en la línea celular CAPAN-2 (adenocarcinoma de páncreas) mediante Western blot (figura 18). El análisis de las bandas obtenidas en el Western blot mostró la presencia de una banda clara con un peso molecular próximo al de la MT1-MMP (57 kDa), además de una banda de mayor peso molecular (cerca a 75 kDa) que podría corresponderse con MT1-MMP tras sufrir modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, glicosilación. La línea celular MCF7 se utilizó como control negativo para la expresión de MT1-MMP.

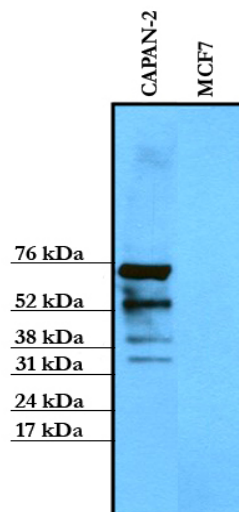
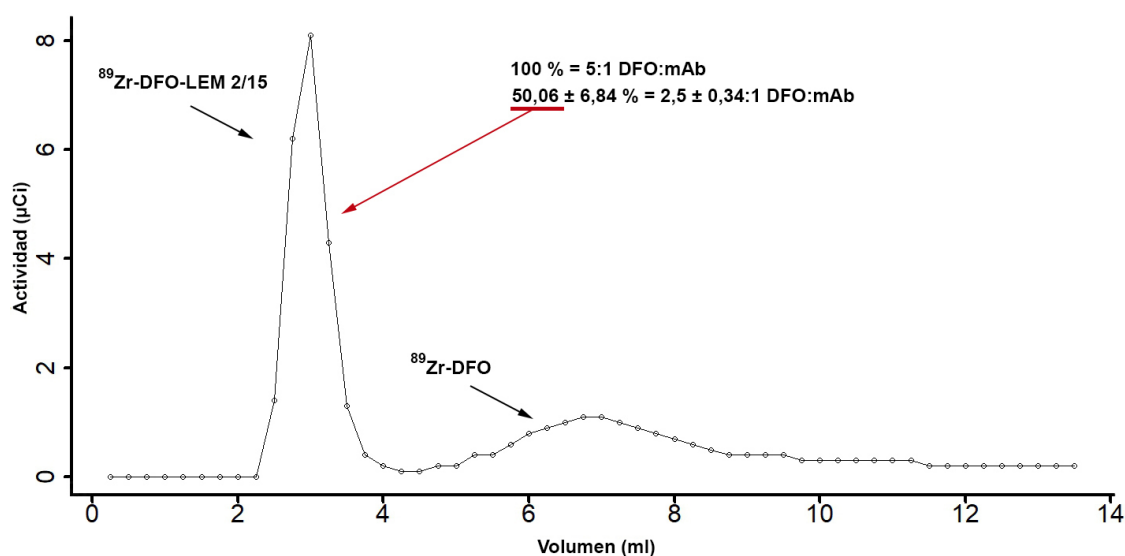


Figura 18. Expresión de MT1-MMP mediante Western blot de la línea celular CAPAN-2 (adenocarcinoma de páncreas). Como control negativo de expresión se empleó la línea celular MCF7 de cáncer de mama.

## 2. Radioquímica

### 2.1. $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15

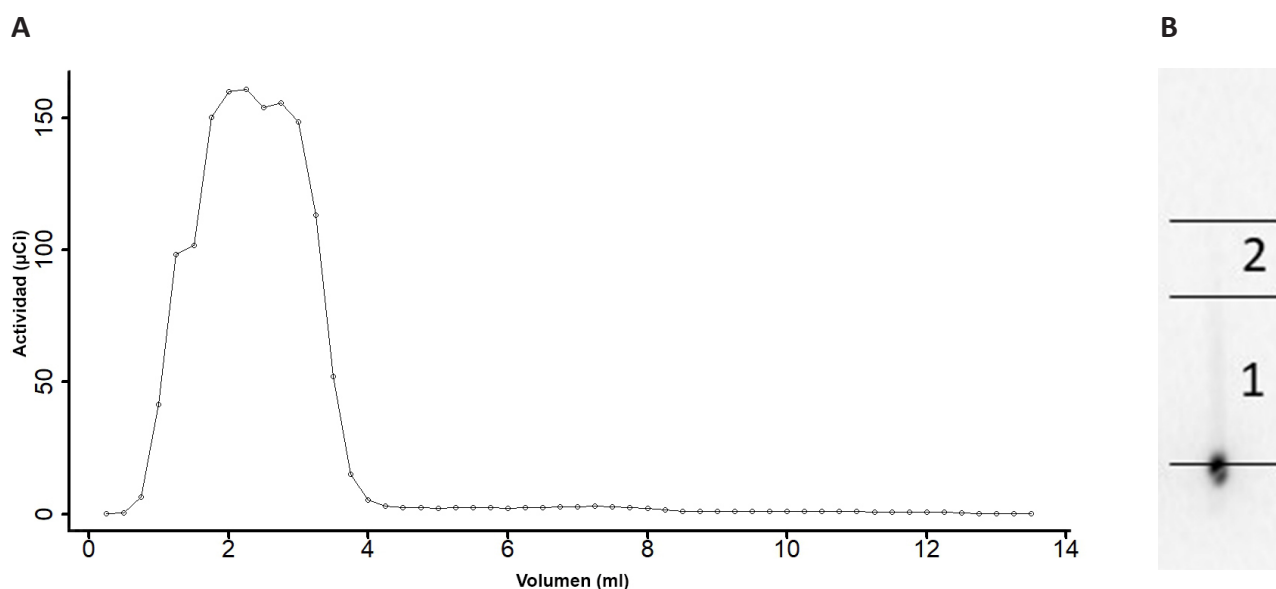
El anticuerpo LEM 2/15 se conjugó con DFO (en una relación 5:1) a 37 °C durante 40 minutos. El perfil de elución de la mezcla de conjugación en la columna PD-10, antes de purificar el anticuerpo conjugado y tras ser marcado con una pequeña cantidad de  $^{89}\text{Zr}$  se muestra en la figura 19; se aprecia un pico mayoritario en las primeras fracciones que se corresponde con el anticuerpo marcado ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15), mientras que el pico correspondiente a  $^{89}\text{Zr}$ -DFO eluye más tarde de la columna. El número calculado de moléculas de DFO por cada molécula de LEM 2/15 fue de  $2,5 \pm 0,34$  ( $n = 2$ ).



**Figura 19.** Perfil de elución del anticuerpo LEM 2/15 conjugado sin purificar, posteriormente marcado con  $^{89}\text{Zr}$  y separado por una columna PD-10.

Una vez separado el anticuerpo conjugado (DFO-LEM 2/15) de la DFO libre, se procedió a su marcaje con  $^{89}\text{Zr}$ . El perfil cromatográfico obtenido tras pasar la mezcla de marcaje por una columna PD-10 se muestra en la figura 20; la mayor parte de la radiactividad, correspondiente a  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $90,51 \pm 3,44$  %,  $n = 8$ ), se eluyó en los primeros 4 ml. El rendimiento radioquímico y la actividad específica del anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue de  $75,35 \pm 12,36$  % y  $68,67 \pm 12,03$  MBq/mg ( $1,86 \pm 0,33$  mCi/mg), respectivamente. La pureza radioquímica del producto final, estimada por ITLC, fue muy alta ( $98,18 \pm 2,59$  %,  $n = 5$ ) (figura 20 B). Un aspecto a tener en cuenta a la hora de conjugar y marcar el mAb con DFO es el tiempo que permanece congelada la DFO desde que se disuelve en DMSO hasta su utilización. Así, el uso de DFO-DMSO congelada a -20 °C por periodos superiores a 10 meses reduce tanto el rendimiento radioquímico como la actividad específica considerablemente.





**Figura 20.** Radiomarcaje de DFO-LEM 2/15 con  $^{89}\text{Zr}$ . **A.** Perfil de elución de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en la columna PD-10 y **B.** Autorradiografía de ITLC de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 purificado. En la sección 1 se localizaría la muestra de mAb marcado mientras que en la sección 2 estaría el radionúclido libre.

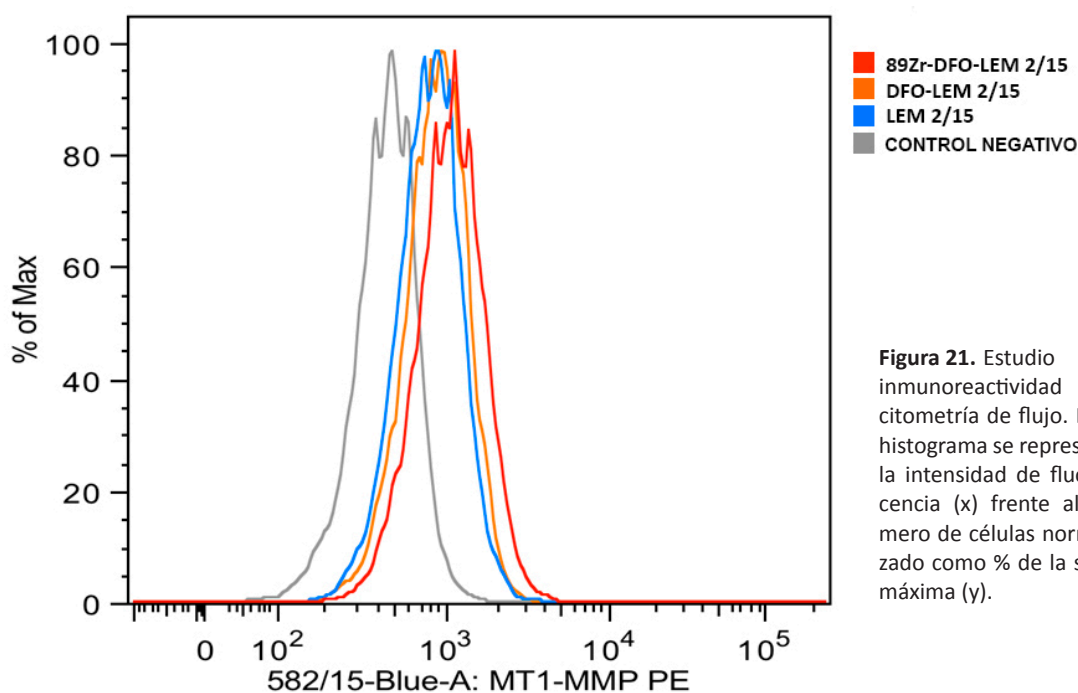
El radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 se incubó durante 7 días tanto en suero como en plasma humano a 4 o 37 °C, con el fin de comprobar su estabilidad en el tiempo (tabla 6). La pureza radioquímica fue muy elevada (cercana al 100 %) en prácticamente todas las condiciones, lo que indicó que  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 sería estable durante al menos 7 días. Solamente se encontró una ligera disminución, estadísticamente significativa, en la estabilidad del radiotrazador en plasma a 37 °C al cabo de los 7 días de incubación. Los resultados indicaron claramente que  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 puede ser un radiotrazador viable para utilizarlo en animales de experimentación durante un periodo de aproximadamente una semana.

**Tabla 6.** Estabilidad de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 incubado en suero y plasma humanos a 4 °C o 37 °C durante 7 días

Días\temp.	Suero (n = 8)		Plasma (n = 8)	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	99,41 ± 0,4 %	98,1 ± 1,31 %	98,57 ± 1,95 %	99,01 ± 1,24 %
1	99,69 ± 0,02 %	99,7 ± 0,21 %	99,26 ± 0,61 %	96,76 ± 2,58 %
2	97,97 ± 2,12 %	95,17 ± 4,93 %	97,92 ± 0,87 %	93,21 ± 5,89 %
7	98,43 ± 1,76 %	95,19 ± 7,04 %	98,97 ± 0,69 %	83,68 ± 3,7 %*

Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

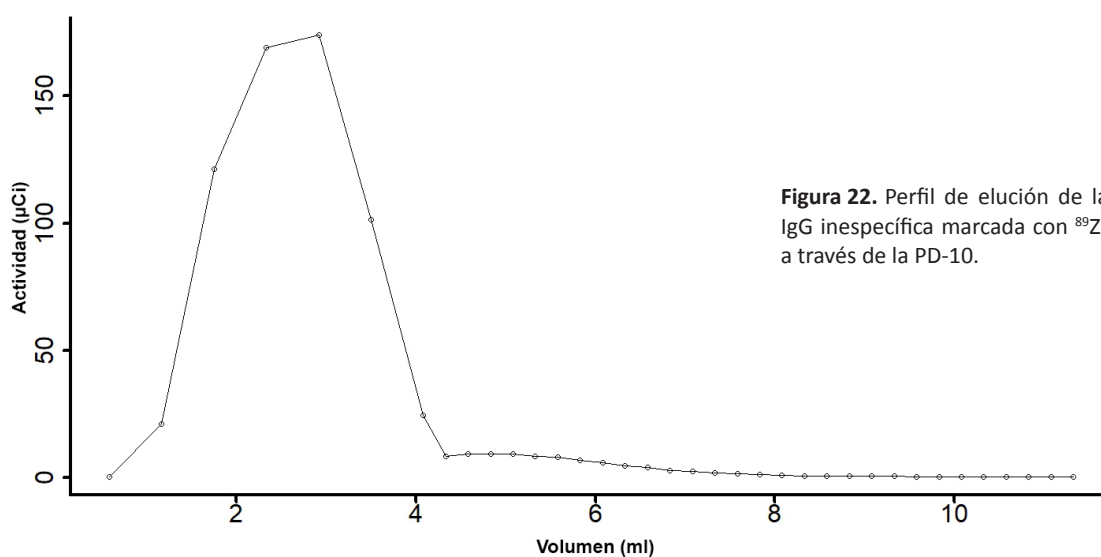
La inmunoreactividad de LEM 2/15 conjugado y marcado se valoró mediante citometría de flujo utilizando una cantidad constante de células U251 y mAb para comprobar si la conjugación y el marcaje podían alterar la especificidad del anticuerpo. Los resultados mostraron que la conjugación del anticuerpo con DFO y su posterior marcaje con  $^{89}\text{Zr}$  no modifica sustancialmente la inmunoreactividad del anticuerpo intacto (figura 21).



**Figura 21.** Estudio de inmunoreactividad por citometría de flujo. En el histograma se representa la intensidad de fluorescencia (x) frente al número de células normalizado como % de la señal máxima (y).

## 2.2. $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica

La conjugación de la IgG inespecífica se realizó en las mismas condiciones que la de LEM 2/15, es decir, se incubó el anticuerpo y la DFO en una relación 5:1 durante 40 minutos a 37 °C. El marcaje de la DFO-IgG inespecífica se realizó en las mismas condiciones que DFO-LEM 2/15 y, aunque el rendimiento medio fue inferior al obtenido con DFO-LEM 2/15, en alguno de los casos se obtuvo un perfil de elución muy similar (figura 22). El rendimiento radioquímico y la actividad específica fue de  $40,64 \pm 24,44$  % y  $20,88 \pm 14,74$  MBq/mg ( $0,56 \pm 0,4$  mCi/mg), respectivamente. De igual forma, la distribución de radiactividad entre los dos picos eluidos de la columna PD-10 ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO/ $^{89}\text{Zr}$  libre) fue variable en los diferentes marcajes, representando la  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica un  $43,9 \pm 27,75$  % ( $n = 4$ ) de la actividad eluida. La pureza radioquímica del producto final determinada por ITLC fue de  $97,23 \pm 3,4$  % ( $n = 2$ ).



**Figura 22.** Perfil de elución de la IgG inespecífica marcada con  $^{89}\text{Zr}$  a través de la PD-10.

La estabilidad de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica fue muy elevada, al igual que para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, aunque la pureza radioquímica para la muestra incubada en plasma a 37 °C comenzó a disminuir a los 2 días (tabla 7). No obstante, este resultado debe tomarse con cautela ya que solo se dispone de los valores correspondientes a un experimento.

**Tabla 7.** Estabilidad de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG incubado en suero y plasma humanos a 4 °C o 37 °C durante 7 días

Días\temp.	Suero (n = 1)		Plasma (n = 1)	
	4 °C	37 °C	4 °C	37 °C
0	97,58 %	97,17 %	97,36 %	98,77 %
1	94,53 %	89,07 %	99,71 %	98,3 %
2	96,72 %	98,61 %	95,89 %	80,63 %
7	97,58 %	96,29 %	98,37 %	83,01 %

### 3. Modelos animales xenografts heterotópicos subcutáneos de glioblastoma

#### 3.1. Modelos animales de U251 y MCF7 (grupo 1)

##### 3.1.1. Estudios de biodistribución *ex vivo* e imagen microPET de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15

Los ensayos de biodistribución *ex vivo* e imagen PET se realizaron utilizando ratones portadores de tumores U251 y MCF7 implantados en los flancos derecho e izquierdo, respectivamente. La figura 23 representa los resultados de la biodistribución *ex vivo* en los diferentes tejidos a 1, 2, 4 y 7 días posinyección. La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en los tumores U251 fue más alta que en MCF7 a las 24 horas posinyección ( $13,09 \pm 2,12$  % ID/g vs.  $9,78 \pm 1,77$ , respectivamente) y fue decreciendo significativamente con el tiempo (tabla 8). Entre U251 y MCF7 hubo diferencias de captación estadísticamente significativas a los 1 y 2 días, pero no a los 4 y 7 días. Además, los datos revelaron una alta captación hepática durante todo el experimento. El hueso fue el único tejido que mostró un incremento significativo a los 7 días posinyección. El esqueleto supone un 10,73 % del peso corporal de un ratón (media utilizada en torno a 24 gr), por tanto, un 4,43, 5,3, 5,2 y 9,09 % de la dosis inyectada se encontraría en el tejido óseo a los 1, 2, 4 y 7 días respectivamente<sup>223</sup>. De igual forma, en estos animales, el porcentaje de dosis inyectada depositada en el hígado a los diferentes tiempos se encuentra entre un 16-20 % (20,06, 16,44, 16,12 y 16,47 % ID a los 1, 2, 4 y 7 días respectivamente). Es decir, estos órganos (hueso e hígado) serían aquellos que recibirían la mayor parte de la dosis de radiación absorbida por el animal.

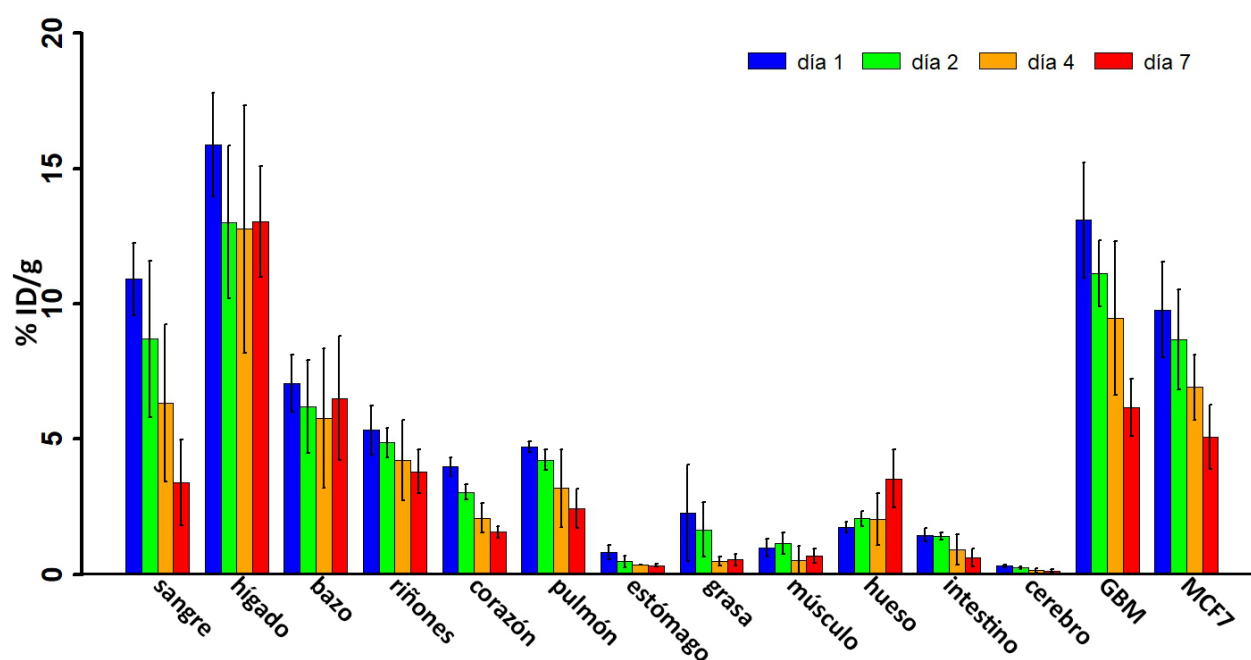
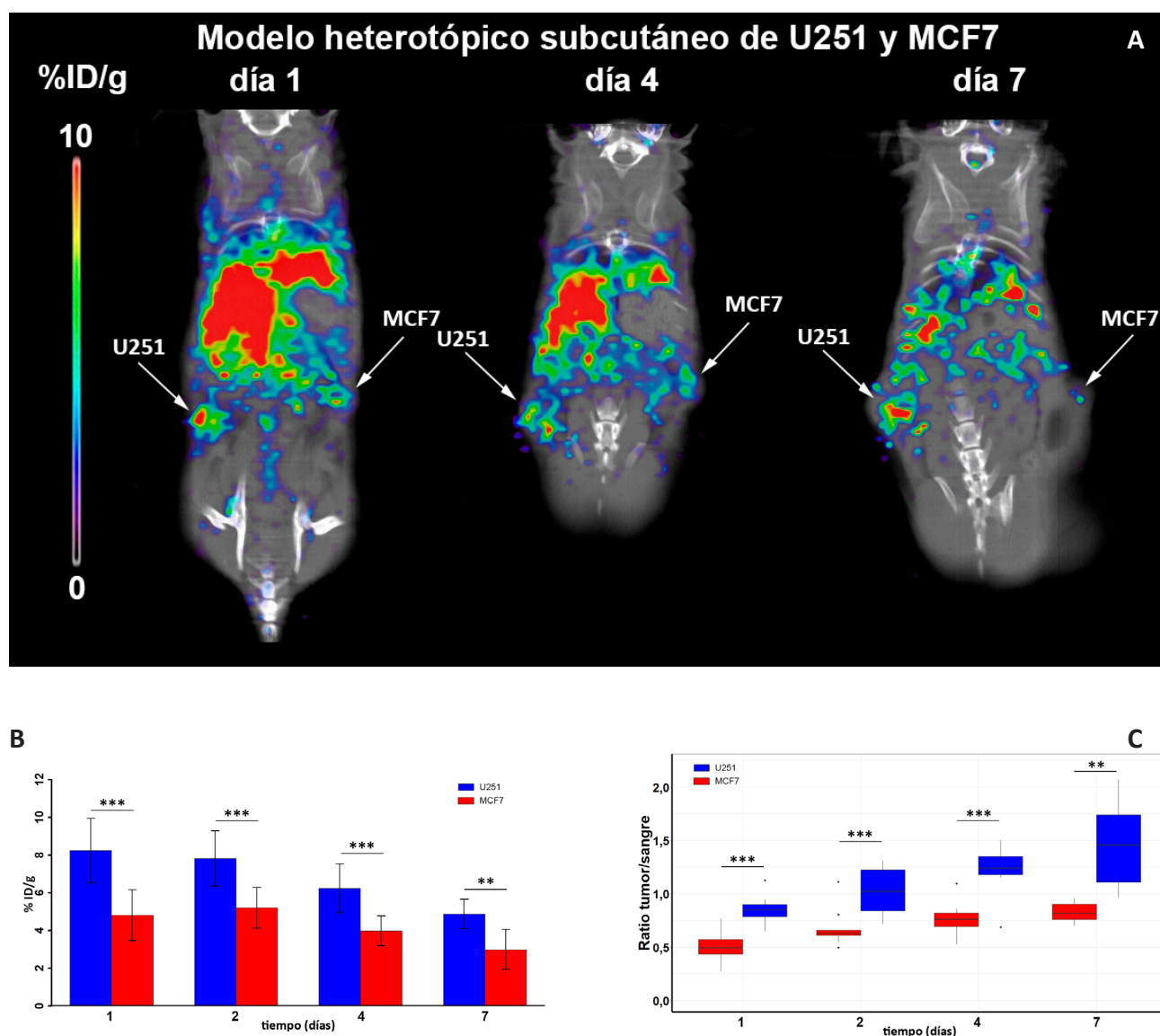


Figura 23. Biodistribución *ex vivo* del modelo xenograft de U251 y MCF7 (n = 14).

Tabla 8. Datos de la biodistribución *ex vivo* de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (% ID/g) en varios tejidos de ratón del modelo xenograft de U251 y MCF7 (n = 14)

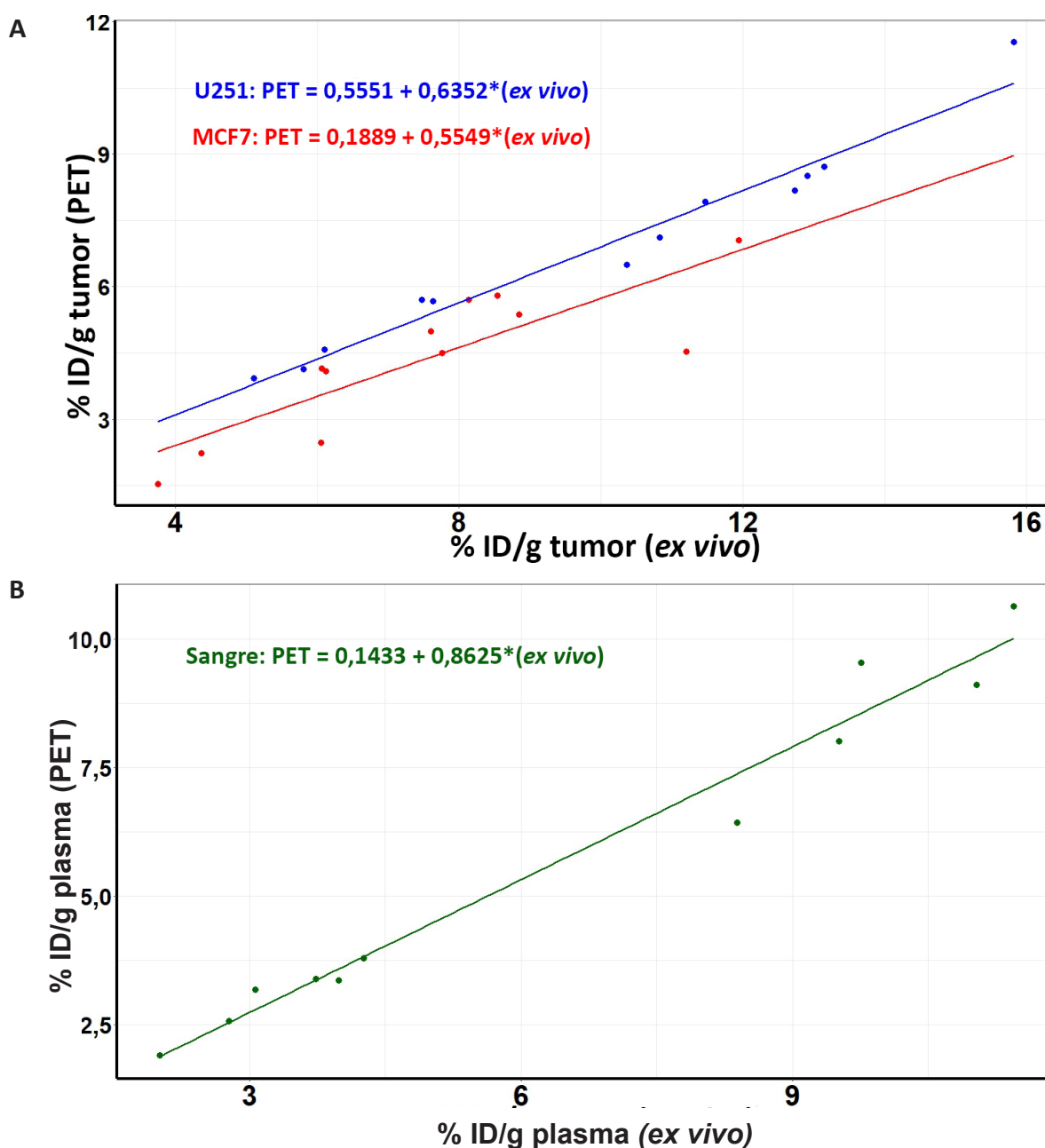
Órganos	1 día (n = 4)	2 días (n = 4)	4 días (n = 2)	7 días (n = 4)
Sangre	10,91 ± 1,34	8,69 ± 2,89	6,33 ± 2,91	3,38 ± 1,59
Corazón	3,98 ± 0,35	3,04 ± 0,27	2,07 ± 0,55	1,56 ± 0,21
Pulmón	4,7 ± 0,20	4,23 ± 0,38	3,18 ± 1,43	2,44 ± 0,73
Hígado	15,89 ± 1,91	13,02 ± 2,83	12,76 ± 4,57	13,04 ± 2,05
Bazo	7,05 ± 1,06	6,2 ± 1,73	5,78 ± 2,58	6,5 ± 2,30
Riñones	5,33 ± 0,90	4,87 ± 0,55	4,22 ± 1,49	3,8 ± 0,81
Músculo	0,98 ± 0,33	1,14 ± 0,40	0,51 ± 0,53	0,67 ± 0,27
Hueso	1,72 ± 0,20	2,06 ± 0,28	2,02 ± 0,96	3,53 ± 1,06
Grasa	2,27 ± 1,80	1,65 ± 1,0	0,49 ± 0,16	0,55 ± 0,21
Estómago	0,81 ± 0,25	0,47 ± 0,23	0,35 ± 0,0	0,33 ± 0,05
Intestino	1,45 ± 0,25	1,41 ± 0,13	0,92 ± 0,56	0,62 ± 0,32
Cerebro	0,31 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,14 ± 0,08	0,13 ± 0,04
Plasma	21,08 ± 1,30	17,33 ± 2,40	10,52 ± 6,05	5,89 ± 2,75
Tumor U251	13,09 ± 2,12	11,11 ± 1,22	9,47 ± 2,83	6,16 ± 1,06
Tumor MCF7	9,78 ± 1,77	8,67 ± 1,85	6,91 ± 1,2	5,07 ± 1,2

Las imágenes realizadas mediante microPET/CT permiten visualizar adecuadamente ambos tumores, y confirman los resultados obtenidos mediante la biodistribución *ex vivo*. El tumor U251 mostró una aparente mayor captación que MCF7 en las imágenes PET (figura 24 A). La señal de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 disminuyó en ambos tumores significativamente a lo largo del experimento. Asimismo, la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en U251 ( $8,23 \pm 1,71$ ,  $7,82 \pm 1,48$ ,  $6,24 \pm 1,29$  y  $4,88 \pm 0,79$  % ID/g a 1, 2, 4 y 7 días posinyección) fue significativamente mayor que en MCF7 ( $4,81 \pm 1,35$ ,  $5,20 \pm 1,08$ ,  $3,97 \pm 0,80$  y  $2,99 \pm 1,06$  % ID/g a 1, 2, 4 y 7 días posinyección) (figura 24 B). La relación en la captación del radiotrazador tumor/sangre fue incrementándose con el tiempo en ambos tumores, siendo significativamente mayor para el tumor U251 ( $0,85 \pm 0,15$ ,  $1,02 \pm 0,42$ ,  $1,24 \pm 0,23$  y  $1,45 \pm 0,83$  a 1, 2, 4 y 7 días posinyección) que para MCF7 ( $0,49 \pm 0,22$ ,  $0,63 \pm 0,15$ ,  $0,76 \pm 0,16$  y  $0,81 \pm 0,20$  a 1, 2, 4 y 7 días posinyección), indicando la utilidad de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 para detectar este tipo de tumores mediante PET.



**Figura 24.** Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en ratones portadores de células U251 con expresión de MT1-MMP y células MCF-7 sin expresión de MT1-MMP ( $n = 14$ ). **A.** Imágenes microPET/CT tomadas a los 1, 4 y 7 días posinyección. **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 por los tumores U251 y MCF7 (% ID/g). **C.** Ratio tumor/sangre. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

La cuantificación de la captación del radiotrazador mediante PET permite realizar un estudio longitudinal en el mismo animal y, de esta manera, reducir el número de animales en cada experimento, al no ser necesario su sacrificio en cada punto experimental. La relación de la captación del radiotrazador en los tumores estimada por ambos métodos (biodistribución *ex vivo* vs. PET) mostró una dependencia lineal con una elevada correlación. La recta de regresión calculada para U251 tiene una pendiente similar a la encontrada para MCF7 (figura 25 A). La variabilidad del % ID/g calculado por PET en función de la biodistribución *ex vivo* se explica mediante las rectas de regresión de U251 y MCF7 ( $R^2 = 96\%$  y  $71\%$ , respectivamente). Asimismo, la correlación entre ambos métodos también se estudió en el *pool* sangre/corazón por el interés que supone utilizar estos datos para un análisis farmacocinético (figura 25 B). Como en los casos anteriores, el modelo de regresión confirmó la dependencia lineal y la variabilidad de los datos PET mediante los datos obtenidos de la biodistribución *ex vivo* ( $R^2 = 97\%$ ). Los resultados de la regresión y correlación entre ambos métodos indican que el análisis cuantitativo de las imágenes PET permite estimar la captación del radiotrazador en diferentes órganos y tejidos, así como evaluar su farmacocinética.



**Figura 25.** Estudios de regresión lineal para los datos extraídos por biodistribución *ex vivo* e imagen PET. **A.** Tumor de la línea celular U251 (azul) y MCF7 (rojo) y **B.** *Pool* sangre/corazón (PET) y sangre (*ex vivo*) (verde).

### 3.1.2. Farmacocinética

Los parámetros farmacocinéticos se determinaron a partir tanto de muestras de plasma extraídas en la biodistribución *ex vivo* como de los datos de imagen PET; ambos datos se obtuvieron de los animales que se sacrifican a lo largo del experimento al finalizar la PET. En el caso de los datos obtenidos de las imágenes PET, el % ID/ml en sangre se estimó mediante la recta de regresión correspondiente (figura 25 C) a partir de los datos del % ID/g del *pool* sangre/corazón. El % ID/ml de plasma se obtuvo de la ratio plasma/sangre obtenida de los valores de la biodistribución *ex vivo* ( $1,81 \pm 0,2$ ). Los valores de los parámetros farmacocinéticos estimados mediante un análisis no compartimental de los datos obtenidos tanto por PET como *ex vivo* fueron similares (tabla 9).

**Tabla 9.** Parámetros farmacocinéticos del estudio de biodistribución *ex vivo* (n = 14) y PET (n = 14)

	Kel (d-1)	$t_{1/2}$ (d)	AUC <sub>0→∞</sub> (% ID*d/g)	MRT (d)	Cl (ml/d)	Vss (ml)
<i>Ex vivo</i>	0,22	3,22	121,06	4,68	0,83	3,87
PET	0,16	4,27	123,02	6,21	0,81	5,05

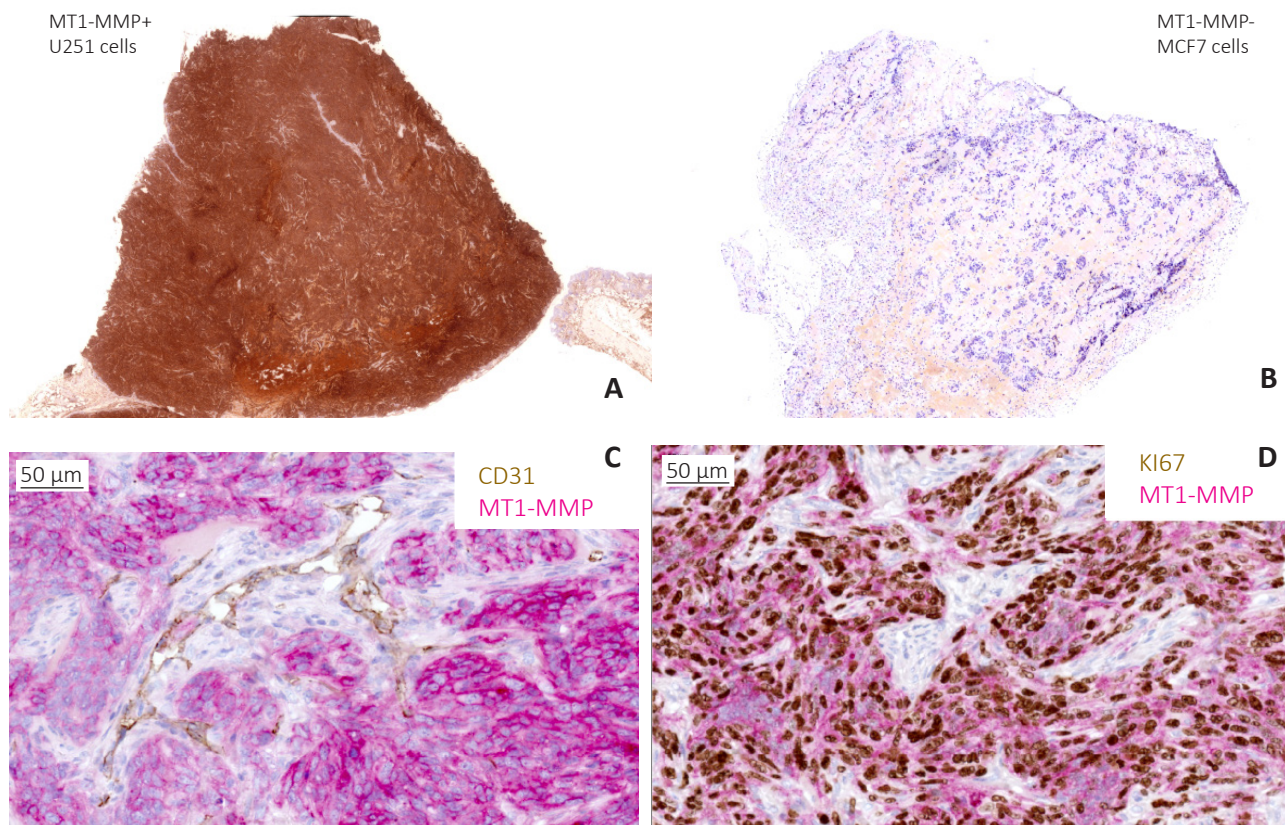
Por otra parte, la PET al tener un carácter no invasivo permite el estudio longitudinal de un mismo animal a lo largo de todo el proceso experimental y, por lo tanto, podemos utilizar los datos del *pool* sangre/corazón de cada animal por separado para realizar un análisis farmacocinético de forma individual con el fin de estimar los valores medios y la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos. Dado que en el estudio de biodistribución *ex vivo*, a 4 de los animales se les hizo PET durante todo el proceso experimental, se obtuvieron los valores medios de los parámetros farmacocinéticos (tabla 10). Además, se realizó un contraste de hipótesis entre estos parámetros y los calculados con la biodistribución *ex vivo* y PET, demostrando que no había diferencias significativas apreciables entre ellos.

**Tabla 10.** Parámetros farmacocinéticos de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 estimados mediante PET en el estudio longitudinal (n = 4)

	Kel (d-1)	$t_{1/2}$ (d)	AUC <sub>0→∞</sub> (% ID*d/g)	MRT (d)	Cl (ml/d)	Vss (ml)
PET longitudinal	0,19 ± 0,04	3,70 ± 0,73	109,69 ± 31,78	5,30 ± 1,07	0,97 ± 0,27	4,93 ± 0,51

### 3.1.3. Inmunohistoquímica

Los tumores extraídos de los animales se tiñeron mediante inmunohistoquímica utilizando LEM 2/15. Este estudio confirmó la elevada expresión de MT1-MMP en los modelos tumorales de U251 (figura 26 A) y su ausencia en los tumores MCF7 (figura 26 B). Además, para determinar con más precisión la localización de MT1-MMP se realizó una doble tinción con LEM 2/15 y un marcador de proliferación tumoral (Ki67) o un marcador vascular (CD31). Las células tumorales (Ki67+) se tiñeron para MT1-MMP (figura 26 C), mientras que la mayoría de las células endoteliales (CD31+) no se tiñeron con LEM 2/15 (figura 26 D), lo cual demuestra que la expresión de MT1-MMP se localiza en las células tumorales con capacidad de proliferación.



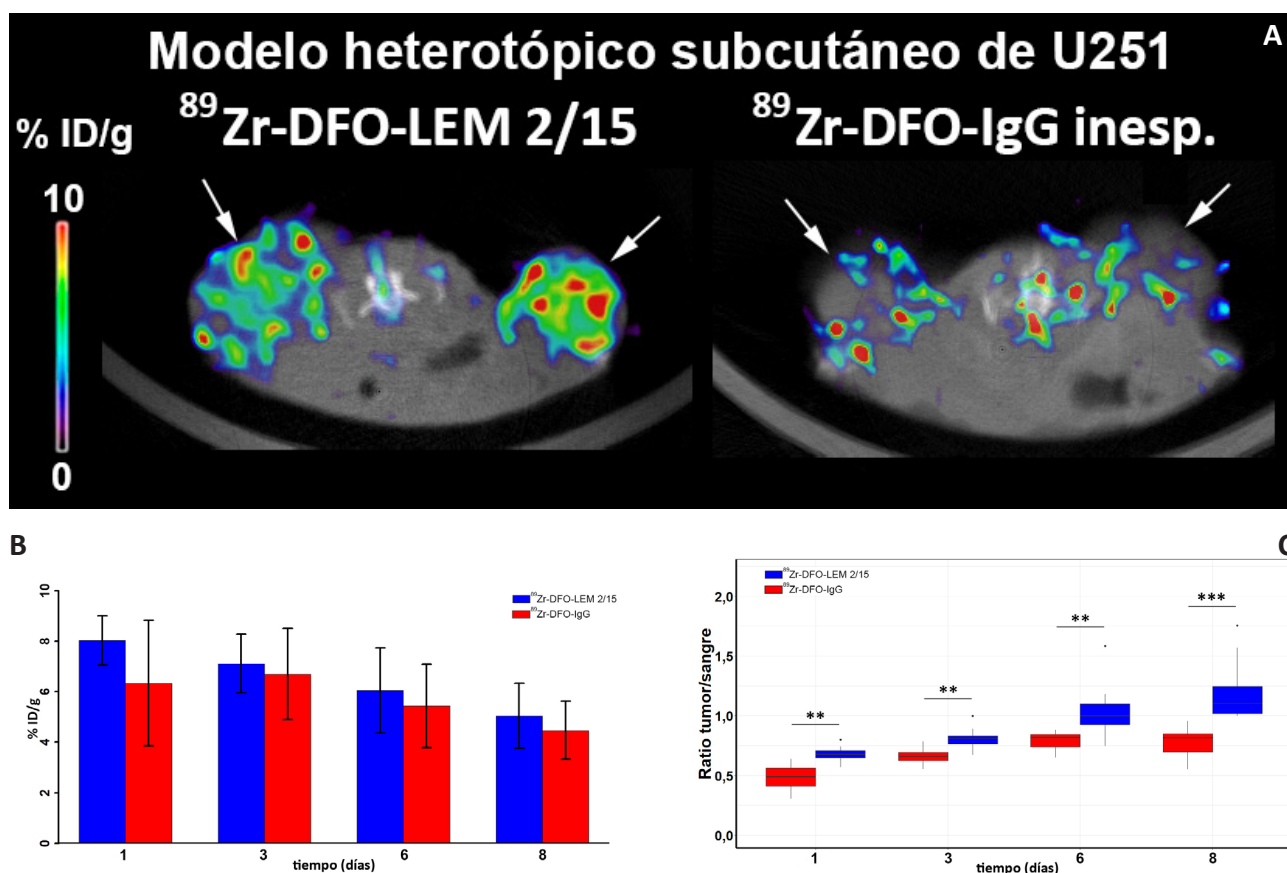
**Figura 26.** Inmunohistoquímica del tejido tumoral de los ratones portadores de células U251 y MCF7. **A.** Corte de inmunohistoquímica de un tumor U251 teñido con LEM 2/15 positivo para MT1-MMP. Escala: 500  $\mu$ m. **B.** Corte de inmunohistoquímica de un tumor MCF7 teñido con LEM 2/15 negativo para MT1-MMP. Escala: 500  $\mu$ m. **C.** Corte de doble inmunotinción de un tumor U251 para MT1-MMP (rosa) y Ki67 (marrón). Escala: 50  $\mu$ m. **D.** Corte de doble inmunotinción de un tumor U251 para MT1-MMP (rosa) y CD31 (marrón). Escala: 50  $\mu$ m.

## 3.2. Modelos animales de U251 (grupo 2)

### 3.2.1. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 vs. $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica

La imagen PET mostró una mayor captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 que de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (figura 27 A). La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue ligeramente mayor ( $8,04 \pm 0,97$ ,  $7,12 \pm 1,17$ ,  $6,05 \pm 1,69$  y  $5,05 \pm 1,29$  % ID/g a 1, 3, 6 y 8 días posinyección) que la de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $6,34 \pm 2,48$ ,  $6,71 \pm 1,81$ ,  $5,44 \pm 1,65$  y  $4,47 \pm 1,15$  % ID/g a los 1, 3, 6 y 8 días posinyección), aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos; la captación disminuyó significativamente a lo largo del tiempo tras la administración de ambos anticuerpos (figura 27 B). Sin embargo, la ratio tumor/sangre de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $0,67 \pm 0,08$ ,  $0,81 \pm 0,09$ ,  $1,00 \pm 0,30$  y  $1,10 \pm 0,33$  a 1, 3, 6 y 8 días posinyección) fue significativamente superior a la de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $0,49 \pm 0,20$ ,  $0,66 \pm 0,13$ ,  $0,82 \pm 0,16$  y  $0,82 \pm 0,25$  a 1, 3, 6 y 8 días posinyección), y se incrementó de forma significativa a lo largo del experimento (figura 27 B). Por último, también se analizó por imagen la captación hepática de ambos radiotrazadores con el fin de comprobar si existían diferencias en su eliminación por el hígado. Los resultados fueron ligeramente superiores para el anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $10,65 \pm 1,02$ ,  $9,30 \pm 1,66$ ,  $8,33 \pm 1,44$  y  $7,99 \pm 1,69$  % ID/g a 1, 3, 6 y 8 días posinyección) que para la  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $9,06 \pm 0,47$ ,  $8,35 \pm 0,84$ ,  $7,17 \pm 0,64$  y  $6,61 \pm 0,44$  % ID/g a 1, 3, 6 y 8 días posinyección). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas excepto para el primer día del experimento.





**Figura 27.** Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 6$ ) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $n = 4$ ) en ratones portadores de células U251 que expresan MT1-MMP. **A.** Corte axial de imágenes microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (izquierda) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (derecha) inyectados a los 8 días. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) a los 1, 3, 6 y 8 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre de la captación de los anticuerpos radiomarcados. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 3.2.2. Farmacocinética

El estudio farmacocinético no compartimental derivado de los datos de % ID/ml de plasma, obtenidos a partir del *pool* sangre/corazón de las imágenes PET, mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos mAb radiomarcados (tabla 11).

**Tabla 11.** Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal de U251 inyectado con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 6$ ) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $n = 4$ )

Anticuerpo	Kel (d-1)	$t_{1/2}$ (d)	AUC <sub>0-∞</sub> (% ID*d/g)	MRT (d)	Cl (ml/d)	Vss (ml)
LEM 2/15	0,15 ± 0,01	4,59 ± 0,30	184,49 ± 28,17	6,51 ± 0,68	0,56 ± 0,10	3,60 ± 0,68
IgG inespecífica	0,14 ± 0,003	4,85 ± 0,09	245,13 ± 61,79	7,24 ± 0,45	0,43 ± 0,12	3,13 ± 1,03

Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

La comparación de los parámetros obtenidos de los animales inyectados con 20  $\mu\text{g}$  de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (grupo 1) y de los inyectados con 65  $\mu\text{g}$  (grupo 2) puso en evidencia que el aclaramiento plasmático disminuyó significativamente al aumentar la dosis inyectada (tabla 12), debido a que tanto la constante de eliminación como

el volumen de distribución en estado estacionario también disminuyeron al incrementarse la dosis ( $Cl = Kel \cdot V_{ss}$ ). Además, el área bajo la curva se incrementó al aumentar la dosis. Estos resultados demostraron que la farmacocinética del anticuerpo no fue lineal a las dosis inyectadas de LEM 2/15 como consecuencia de su aclaramiento específico (mediado por la unión específica del mAb a su diana); por tanto, al menos a la dosis de 20  $\mu\text{g}$ , la diana (MT1-MMP) no está saturada.

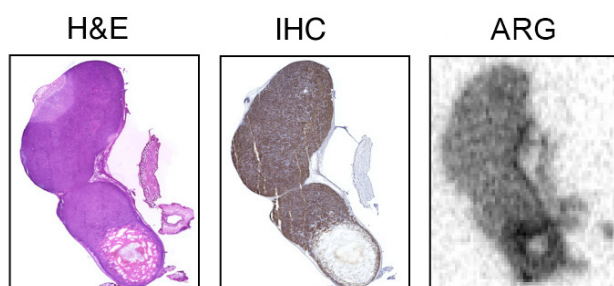
**Tabla 12.** Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal de U251 inyectado con 20  $\mu\text{g}$  (grupo 1,  $n = 4$ ) o 65  $\mu\text{g}$  (grupo 2,  $n = 6$ ) de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15

$^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15	Kel (d-1)	$t_{1/2}$ (d)	AUC <sub>0→∞</sub> (% ID*d/g)	MRT (d)	Cl (ml/d)	V <sub>ss</sub> (ml)
Grupo 1 (20 $\mu\text{g}$ )	0,19 ± 0,04	3,70 ± 0,73	109,69 ± 31,78	5,30 ± 1,07	0,97 ± 0,27	4,93 ± 0,51
Grupo 2 (65 $\mu\text{g}$ )	0,15 ± 0,01	4,59 ± 0,30	184,49 ± 28,17**	6,51 ± 0,68	0,56 ± 0,10*	3,60 ± 0,68**

Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3.2.3. Inmunohistoquímica y autorradiografía

La inmunohistoquímica con LEM 2/15 y la autorradiografía digital revelaron que  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 se distribuía homogéneamente en las regiones que expresaban MT1-MMP en los tumores de U251 (figura 28), confirmando la captación específica del anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15.



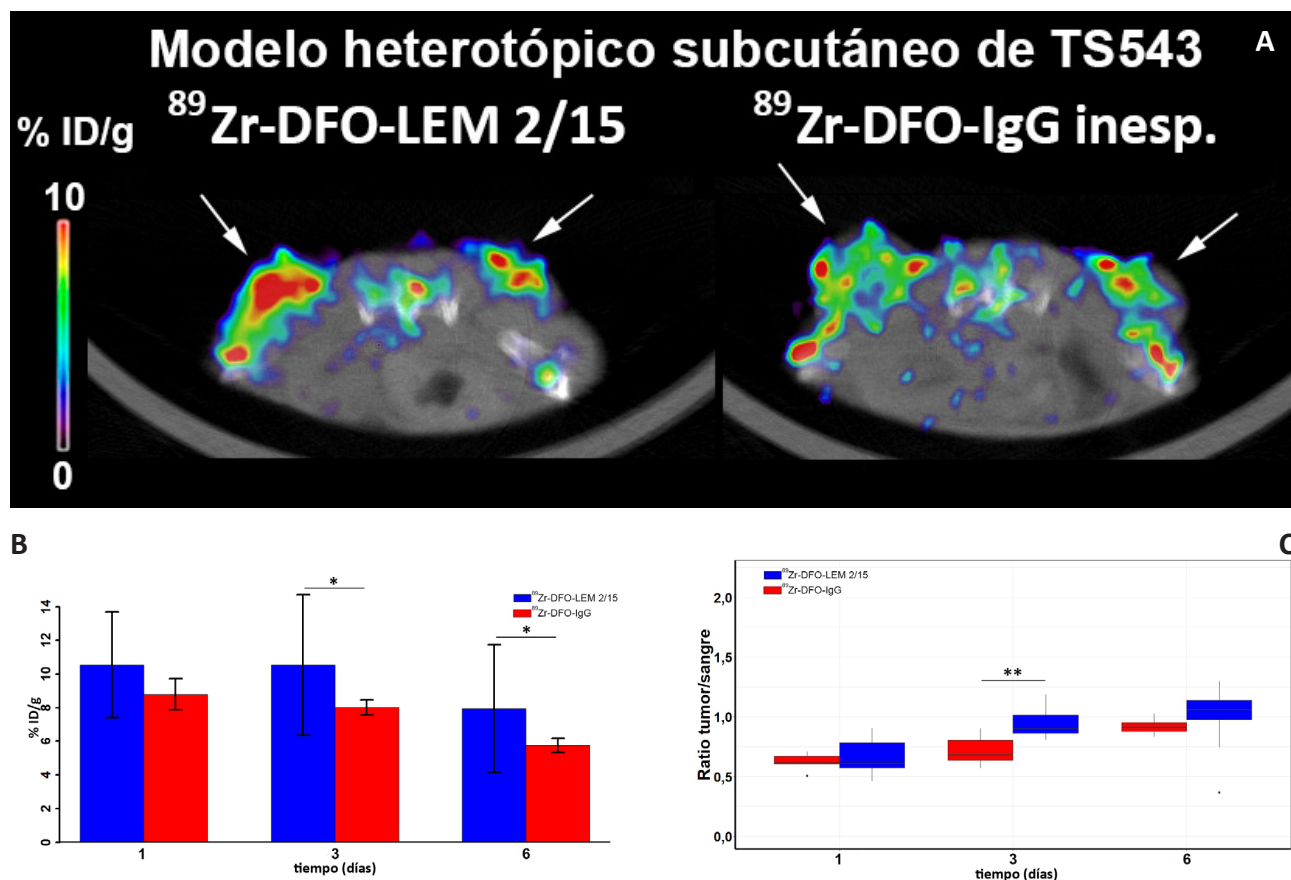
**Figura 28.** Estudio por histología, inmunohistoquímica y autorradiografía de los tumores xenografts heterotópicos subcutáneos de U251. Tinción hematoxilina y eosina (H&E), inmunohistoquímica realizada con el anticuerpo LEM 2/15 (IHC) y autorradiografía (ARG).

## 3.3. Modelos animales de TS543 (grupo 3)

### 3.3.1. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 vs. $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica

La imagen PET mostró una aparente mayor captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 que de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (figura 29 A). La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (10,54 ± 3,14, 10,54 ± 4,17 y 7,94 ± 3,88 % ID/g a 1, 3 y 6 días) fue ligeramente mayor que la de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (8,79 ± 0,92, 8,01 ± 0,45 y 5,76 ± 0,43 % ID/g a 1, 3 y 6 días), encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos anticuerpos a los 3 y 6 días posinyección (figura 29 B). La ratio tumor/sangre de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (0,61 ± 0,25, 0,90 ± 0,18 y 1,06 ± 0,22 a 1, 3 y 6 días) fue similar a la observada para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (0,61 ± 0,11, 0,68 ± 0,24 y 0,91 ± 0,15 a 1, 3 y 6 días), excepto al tercer día tras la inyección, siendo significativamente mayor (figura 29 C). Por último, al igual que en el grupo anterior, también se analizó por imagen la captación hepática de ambos radiotrazadores.

Los resultados para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $11,56 \pm 4,61$ ,  $11,35 \pm 4,12$  y  $12,29 \pm 4,97$  % ID/g a 1, 3 y 6 días posinyección) fueron similares a los de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $10,19 \pm 0,76$ ,  $11,14 \pm 1,66$  y  $10,98 \pm 3,91$  % ID/g a 1, 3 y 6 días posinyección), y ligeramente superiores a los obtenidos en el modelo de U251.

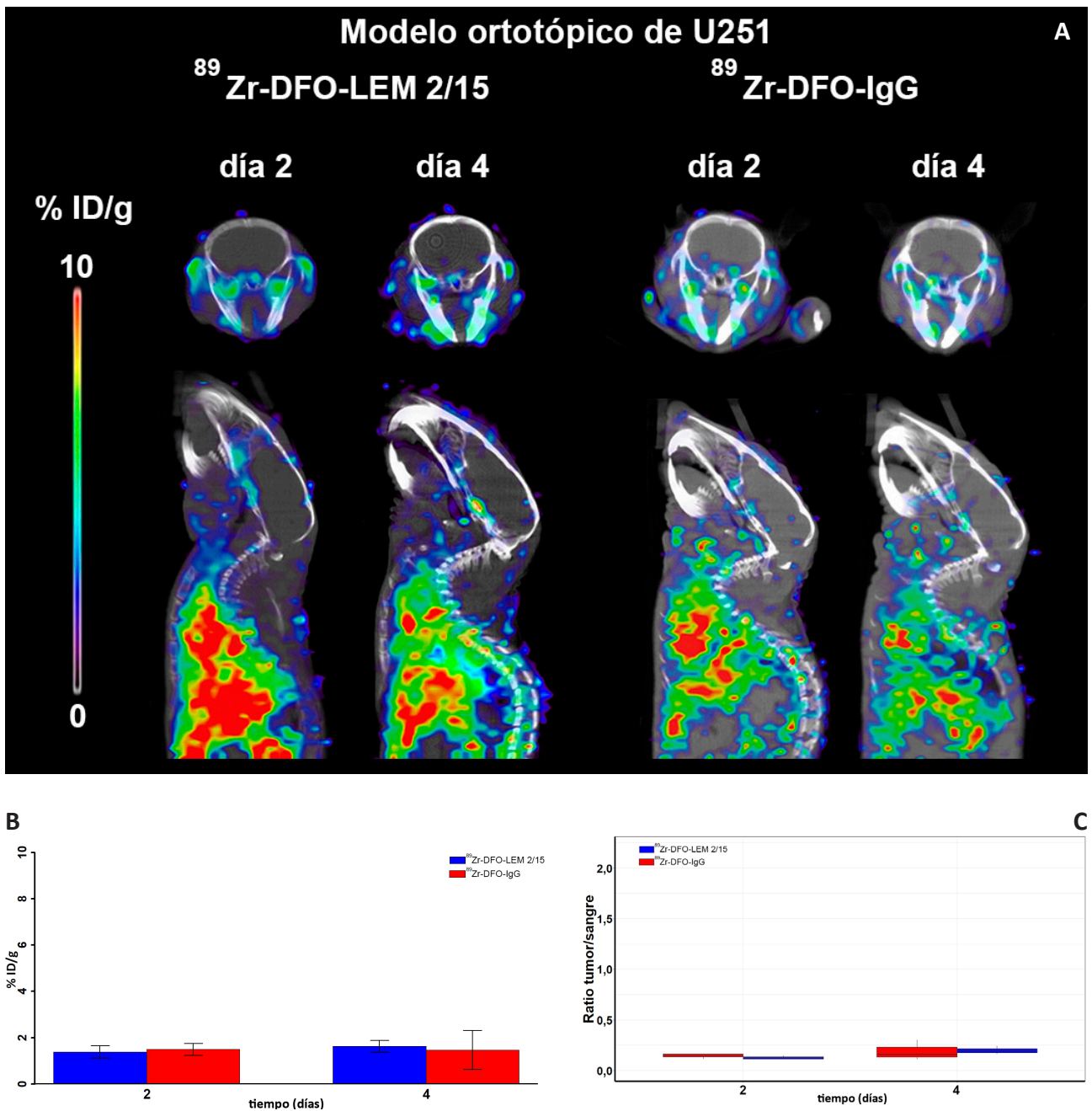


**Figura 29.** Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 6$ ) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $n = 3$ ) en ratones portadores de células TS543 que expresan MT1-MMP. **A.** Corte axial de imágenes microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (izquierda) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (derecha) inyectados a los 6 días. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) a los 1, 3 y 6 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre de la captación de los anticuerpos radiomarcados. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*).

## 4. Modelos animales ortotópicos de glioblastoma

### 4.1. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 vs. $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica en modelos animales de U251 (grupo 4)

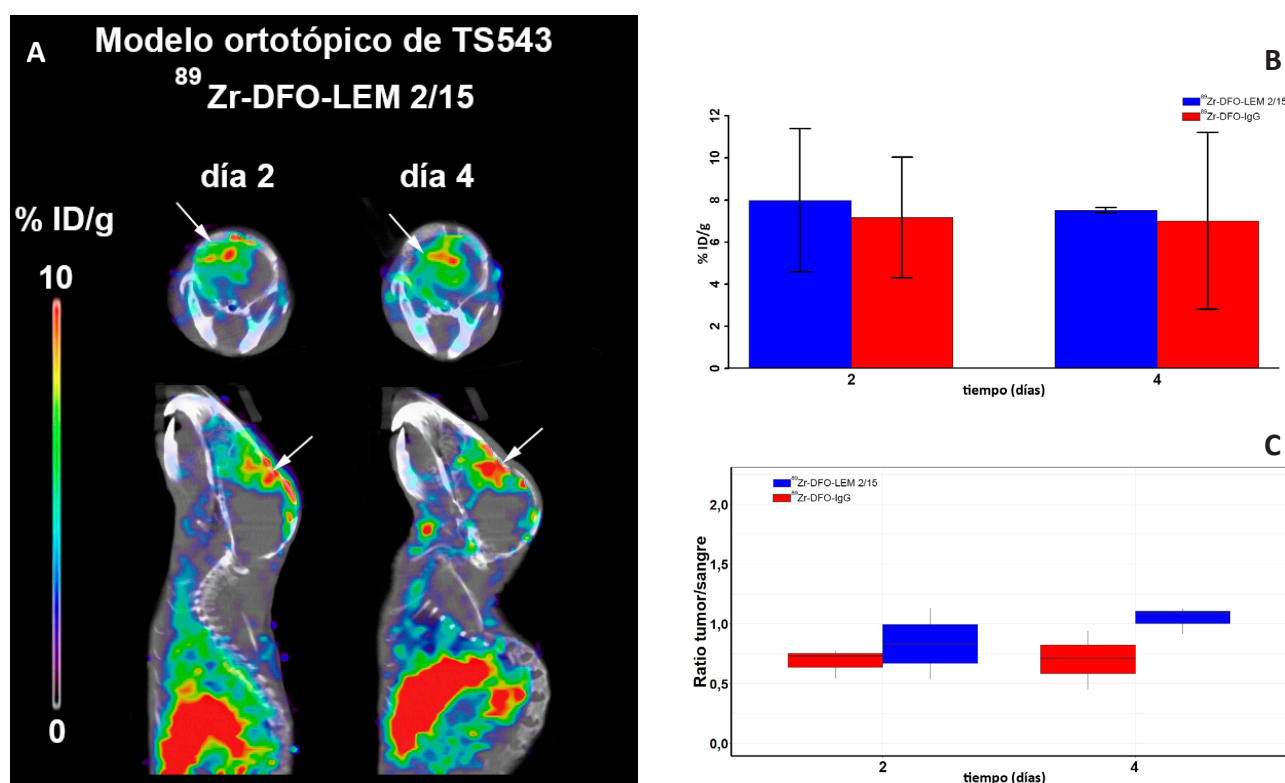
La imagen PET mostró que no hubo prácticamente captación de ambos anticuerpos ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica) en el cerebro (figura 30 A). La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en este modelo fue muy inferior a la obtenida en los xenografts heterotópicos subcutáneos de U251 ( $1,38 \pm 0,27$  vs.  $7,82 \pm 1,48$  % ID/g en modelo ortotópico vs. modelo xenograft heterotópico subcutáneo para  $20 \mu\text{g}$  a los 2 días, respectivamente); además, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos anticuerpos (figura 30 B). La ratio tumor/sangre fue muy pequeña, sin diferencias significativas entre ambos anticuerpos (figura 30 C). Los resultados de captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $11,40 \pm 0,70$  y  $10,78 \pm 1,71$  % ID/g a 2 y 4 días posinyección) fueron mayores que para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $8,36 \pm 1,52$  y  $8,47 \pm 2,86$  % ID/g a 2 y 4 días posinyección), con diferencias estadísticamente significativas a los 2 días posadministración.



**Figura 30.** Estudios de microPET/CT de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 (n = 5) y <sup>89</sup>Zr-DFO-IgG inespecífica (n = 5) en ratones portadores de células U251 que expresan MT1-MMP implantadas intracranalmente. **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) a los 2 y 4 días posinyección con <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 (izquierda) o <sup>89</sup>Zr-DFO-IgG inespecífica (derecha). **B.** Captación de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 y <sup>89</sup>Zr-DFO-IgG inespecífica (% ID/g) en modelos ortotópicos de U251 a los 2 y 4 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre de la captación de los anticuerpos radiomarcados. Diferencias estadísticamente significativas: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

## 4.2. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 vs. $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica en modelos animales de TS543 (grupo 5)

La imagen PET de los animales portadores de las neuroesferas TS543 inyectados con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 mostró captación en el cerebro (figura 31 A). Este modelo ortotópico reveló una captación muy variable en ambos anticuerpos, además, la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $7,98 \pm 3,40$  y  $7,51 \pm 0,13$  % ID/g a los 2 y 4 días posinyección) fue similar a la encontrada para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $7,17 \pm 2,87$  y  $7,00 \pm 4,20$  % ID/g a los 2 y 4 días posinyección) (figura 31 B). Únicamente se muestran los resultados a 2 y 4 días posinyección debido a la agresividad de estos tumores, lo que hace que no se disponga de suficientes animales a partir de pocos días tras la administración del anticuerpo. Las relaciones tumor/sangre fueron ligeramente superiores tras administrar  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $0,83 \pm 0,50$  y  $1,09 \pm 0,21$  a los 2 y 4 días posinyección) que  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $0,73 \pm 0,23$  y  $0,71 \pm 0,49$  a los 2 y 4 días posinyección), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (figura 31 C). La captación hepática de ambos anticuerpos fue similar a la encontrada en otros grupos, aunque en este caso los resultados para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $12,04 \pm 1,44$  y  $11,92 \pm 3,03$  % ID/g a 2 y 4 días posinyección) fueron mayores que para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $8,05 \pm 1,75$  y  $7,90 \pm 1,30$  % ID/g a 2 y 4 días posinyección), con diferencias estadísticamente significativas durante el segundo día.



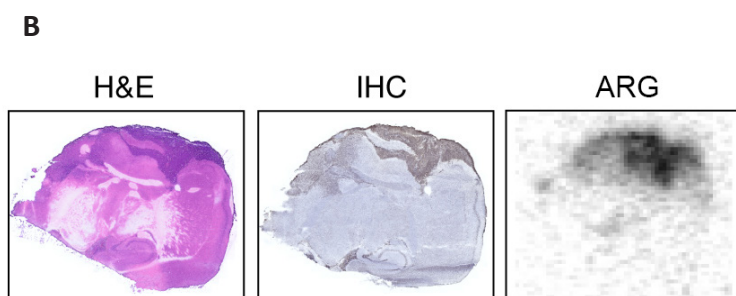
**Figura 31.** Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 5$ ) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $n = 3$ ) en ratones portadores de células TS543 que expresan MT1-MMP implantadas intracranalmente. **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) a los 2 y 4 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Estudio cuantitativo de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) en modelos ortotópicos de TS543 a los 2 y 4 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 4.3. Tinción de Evans

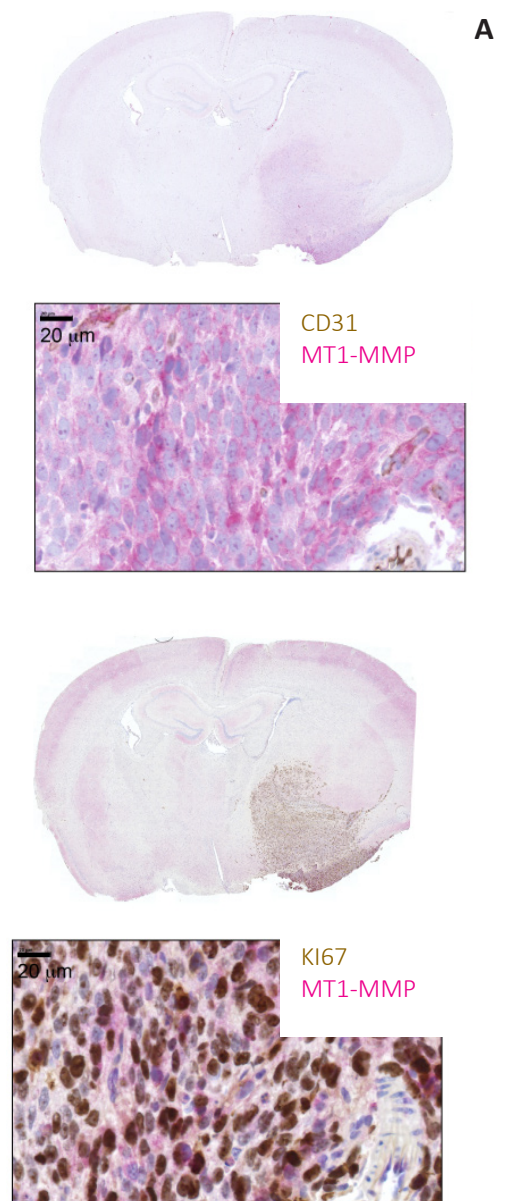
El colorante azul de Evans se empleó como marcador de la integridad de la barrera hematoencefálica en ambos modelos ortotópicos. El modelo U251 mostró una tinción significativamente más baja que el TS543 ( $9,14 \pm 3,14$  y  $39,35 \pm 26,83$   $\mu\text{g}$  de azul de Evans/g de tejido, respectivamente). Los ratones control con/sin una cirugía simulada de implantación de células tumorales mostraron una tinción muy inferior ( $2,12 \pm 0,77$  y  $2,03 \pm 0,51$   $\mu\text{g}$  de azul de Evans/g de tejido, respectivamente). Estos resultados indicaron claramente que la integridad de la barrera hematoencefálica se encuentra bastante más alterada en el modelo de neuroesferas TS543 que en el modelo de la línea celular U251.

### 4.4. Inmunohistoquímica y autorradiografía

Las secciones de los cerebros de los ratones portadores de neuroesferas TS543 se procesaron convenientemente para comprobar si la posible localización de MT1-MMP con el anticuerpo LEM 2/15 se correspondía con su presencia en células con un alto índice de proliferación (Ki67) y/o en células del endotelio vascular (CD31). Los resultados confirmaron que la expresión de MT1-MMP se detectó en las células tumorales, pero no en el tejido sano o en las células endoteliales vasculares (figura 32 A). Además, se comprobó mediante autorradiografía, la colocalización del radiotrazador ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15) con la expresión de MT1-MMP, visualizada mediante inmunohistoquímica (figura 32 B).



**Figura 32.** Estudio por histología, inmunohistoquímica y autorradiografía de los tumores ortotópicos de TS543. **A.** Imágenes del cerebro con una doble tinción para MT1-MMP y un marcador vascular (CD31) o tumoral (Ki67). **B.** Hematoxilina y eosina (H&E), inmunohistoquímica con LEM 2/15 y autorradiografía (ARG) de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 que confirma la colocalización del radiotrazador con la expresión de MT1-MMP.

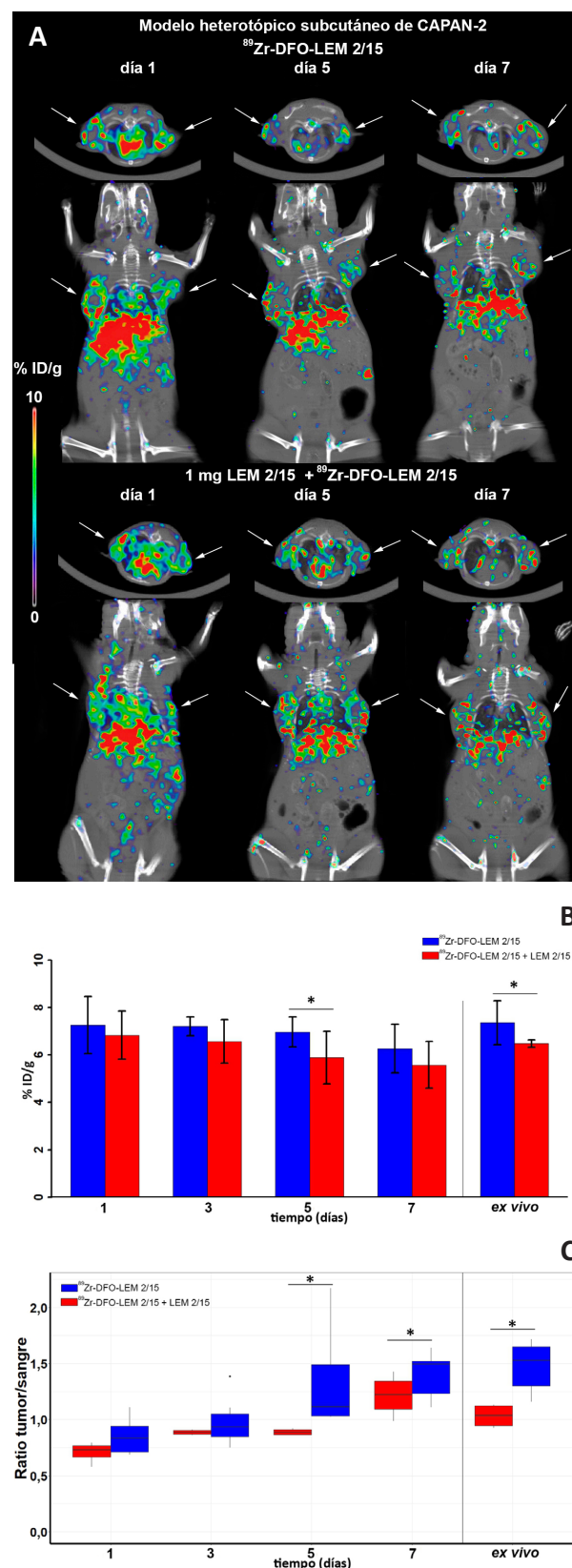


## 5. Modelo animal xenograft heterotópico subcutáneo de adenocarcinoma ductal pancreático

### 5.1. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en modelos animales de CAPAN-2 (grupo 6)

Dos subgrupos de animales xenograft (modelo de PDAC) fueron administrados con el anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y, además, a uno de los subgrupos se le administró también 1 mg de LEM 2/15 con el fin de saturar su aclaramiento mediado por MT1-MMP. La inyección en exceso de LEM 2/15 no tuvo una repercusión clara en la distribución de la actividad, tal cual muestran las imágenes PET (figura 33 A); en algunas de las imágenes (figura 33 A, sin bloqueo y día 1) se observó claramente una distribución heterogénea en el tumor, acumulándose la mayor parte de la radiactividad en el exterior del tumor y sin captación en su parte central. La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $7,26 \pm 1,02$ ,  $7,21 \pm 0,92$ ,  $6,97 \pm 1,11$  y  $6,27 \pm 0,98$  % ID/g a los 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente) fue ligeramente mayor que en los animales con bloqueo ( $6,84 \pm 1,20$ ,  $6,57 \pm 0,40$ ,  $5,89 \pm 0,64$  y  $5,58 \pm 1,03$  % ID/g a los 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente), encontrándose diferencias significativas solo a los 5 días posadministración (figura 33 B), y sin variaciones apreciables a lo largo del periodo experimental. Los valores de captación del anticuerpo marcado a los 7 días posinyección, obtenidos mediante biodistribución *ex vivo*, fueron ligeramente superiores a los estimados mediante PET. La ratio tumor/sangre de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $0,83 \pm 0,29$ ,  $0,93 \pm 0,32$ ,  $1,11 \pm 0,83$  y  $1,52 \pm 1,35$  a los 1, 3, 5 y 7 días) fue superior al subgrupo previamente inyectado con LEM 2/15 ( $0,73 \pm 0,18$ ,  $0,89 \pm 0,04$ ,  $0,89 \pm 0,05$  y  $1,22 \pm 0,38$  a los 1, 3, 5 y 7 días), encontrando diferencias significativas en los últimos días

**Figura 33.** Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 4), algunos con 1 mg de LEM 2/15 (n = 2), en ratones portadores de células CAPAN-2. **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) de ratones inyectados con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (mitad superior) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 bloqueado con LEM 2/15 (mitad inferior) a los 1, 5 y 7 días posinyección. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Captación tumoral (expresada en % ID/g) en modelos de CAPAN-2 a los 1, 3, 5 y 7 días posinyección; también se muestra la captación obtenida *ex vivo*. **C.** Ratio tumor/sangre a los 1, 3, 5 y 7 días posinyección. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)



posinyección (figura 33 C). Además, el incremento de las ratios con el tiempo fue significativo. Por último, también se analizó por imagen la captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 con el fin de evaluar si la coadministración de LEM 2/15 no marcado, en exceso, alteraba su biodistribución de forma significativa. Los resultados para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $11,19 \pm 2,22$ ,  $12,35 \pm 1,31$ ,  $10,59 \pm 1,31$  y  $9,21 \pm 1,27$  % ID/g a los 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente) fueron similares a los de los animales inyectados con un exceso de LEM 2/15 ( $10,49 \pm 0,06$ ,  $10,08 \pm 0,74$ ,  $10,15 \pm 0,18$  y  $8,38 \pm 0,68$  % ID/g a los 1, 3, 5 y 7 días, respectivamente).

Los valores de biodistribución *ex vivo* obtenidos a los 7 días tras el sacrificio de los animales se muestran en la tabla 13, junto con los valores obtenidos mediante PET. La captación es ligeramente mayor si se estima *ex vivo* que cuando se hace a partir de las imágenes PET en aquellos tejidos/órganos (hígado, riñón, tumores, sangre, hueso) con una mayor acumulación del anticuerpo marcado, hecho constatado en la mayoría de los estudios cuantitativos PET. Además, los valores obtenidos fueron del mismo orden que los estimados en los modelos xenograft heterotópicos de glioblastoma.

**Tabla 13.** Estudio de biodistribución *ex vivo* y PET a los 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 4), algunos con 1 mg de LEM 2/15 (n = 2), en ratones portadores de tumores CAPAN-2. Los valores se expresan como % ID/g

Órgano	$^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15		$^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 + 1 mg LEM 2/15	
	<i>ex vivo</i>	PET	<i>ex vivo</i>	PET
Sangre	4,35 ± 0,89	3,77 ± 1,09	6,34 ± 0,98	4,59 ± 0,14
Corazón	1,98 ± 0,43	-	2,46 ± 0,15	-
Pulmón	2,80 ± 0,28	-	3,56 ± 0,08	-
Hígado	10,28 ± 2,12	9,21 ± 1,27	10,57 ± 0,88	8,38 ± 0,68
Bazo	7,73 ± 2,75	-	8,78 ± 1,13	-
Riñones	3,70 ± 0,59	2,82 ± 0,49	4,08 ± 0,03	3,07 ± 0,26
Músculo	0,86 ± 0,19*	1,49 ± 0,28*	0,89 ± 0,15	0,85 ± 0,60
Grasa	1,86 ± 0,17	-	2,15 ± 0,51	-
Hueso	5,68 ± 0,55*	3,03 ± 0,71*	4,80 ± 0,47	4,01 ± 0,28
Estómago	0,64 ± 0,40	-	0,74 ± 0,62	-
Intestino	0,89 ± 0,21	-	0,65 ± 0,46	-
Páncreas	0,85 ± 0,21	-	2,37 ± 2,10	-
Cerebro	0,17 ± 0,03*	0,63 ± 0,29*	0,16 ± 0,03*	0,88 ± 0,10*
Plasma	7,70 ± 2,46	-	12,06 ± 2,92	-
CAPAN-2	7,36 ± 0,93	6,27 ± 0,98	6,48 ± 0,16	5,58 ± 1,03

Diferencias estadísticamente significativas: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)



## 5.2. Farmacocinética

El análisis farmacocinético de la variación plasmática de las concentraciones de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 con/sin exceso de LEM 2/15 mostró ligeras diferencias en alguno de los parámetros farmacocinéticos tales como Kel,  $t_{1/2}$ , MRT o CI (tabla 14). El ligero incremento de la semivida biológica de eliminación y del tiempo medio de residencia, junto con la disminución del aclaramiento plasmático puede deberse a que el exceso de LEM 2/15 sature los mecanismos de eliminación tanto específicos como no específicos. La aparente falta de significación estadística, en este caso, probablemente sea debida al pequeño número de animales administrados con un exceso de LEM 2/15 que se han utilizado en el estudio ( $n = 2$ ).

Por otra parte, los valores de los diferentes parámetros farmacocinéticos de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 son muy similares a los obtenidos en los modelos xenograft heterotópicos de GBM con la línea celular U251 (tabla 12), lo que pone de manifiesto la utilidad de los estudios PET para realizar un análisis farmacocinético de anticuerpos marcados con emisores positrónicos en animales de experimentación.

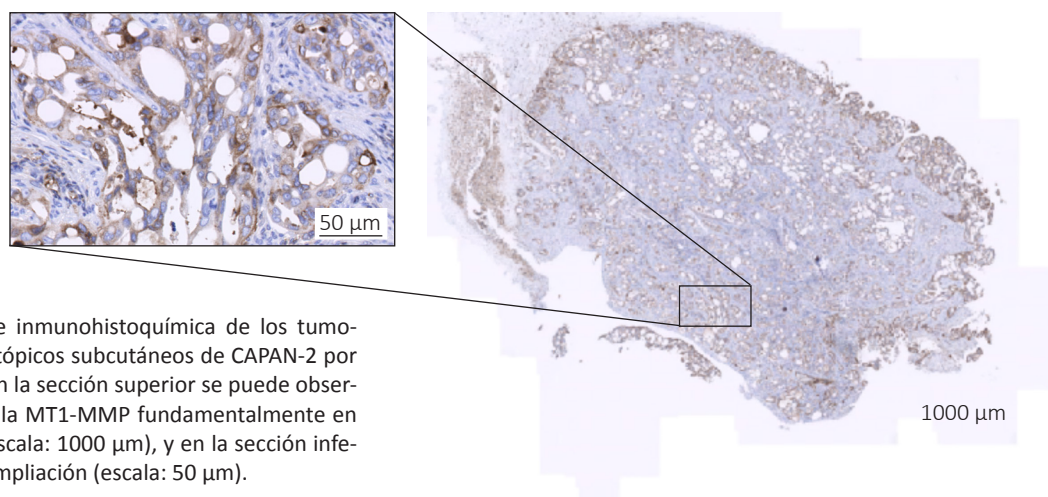
**Tabla 14.** Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal de CAPAN-2 inyectado con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 4$ ) o bloqueado con 1 mg de LEM 2/15 e inyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 2$ )

	Kel (d-1)	$t_{1/2}$ (d)	AUC $_{0-\infty}$ (% ID*d/g)	MRT (d)	CI (ml/d)	Vss (ml)
$^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15	0,17 ± 0,05	4,18 ± 0,94*	145,82 ± 35,39	6,20 ± 1,31*	0,72 ± 0,19	4,28 ± 0,15
Bloqueo	0,12 ± 0,002	5,81 ± 0,14*	185,95 ± 10,06	8,24 ± 0,31*	0,54 ± 0,03	4,44 ± 0,41

Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

## 5.3. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica de las secciones de los tumores de CAPAN-2, 7 días después de la inyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, mostró las características habituales de un PDAC, formado por células atípicas formando estructuras glandulares o tubulares, a menudo complejas e incompletas, de forma irregular y embebidas en un denso estroma desmoplásico. Además, en las secciones analizadas, se observó una mayor expresión de MT1-MMP en los bordes del tumor que en el centro (figura 34), corroborando los resultados obtenidos al analizar las imágenes PET (figura 33A) donde se apreciaba una mayor acumulación de la actividad en la parte externa de los tumores que en su interior.

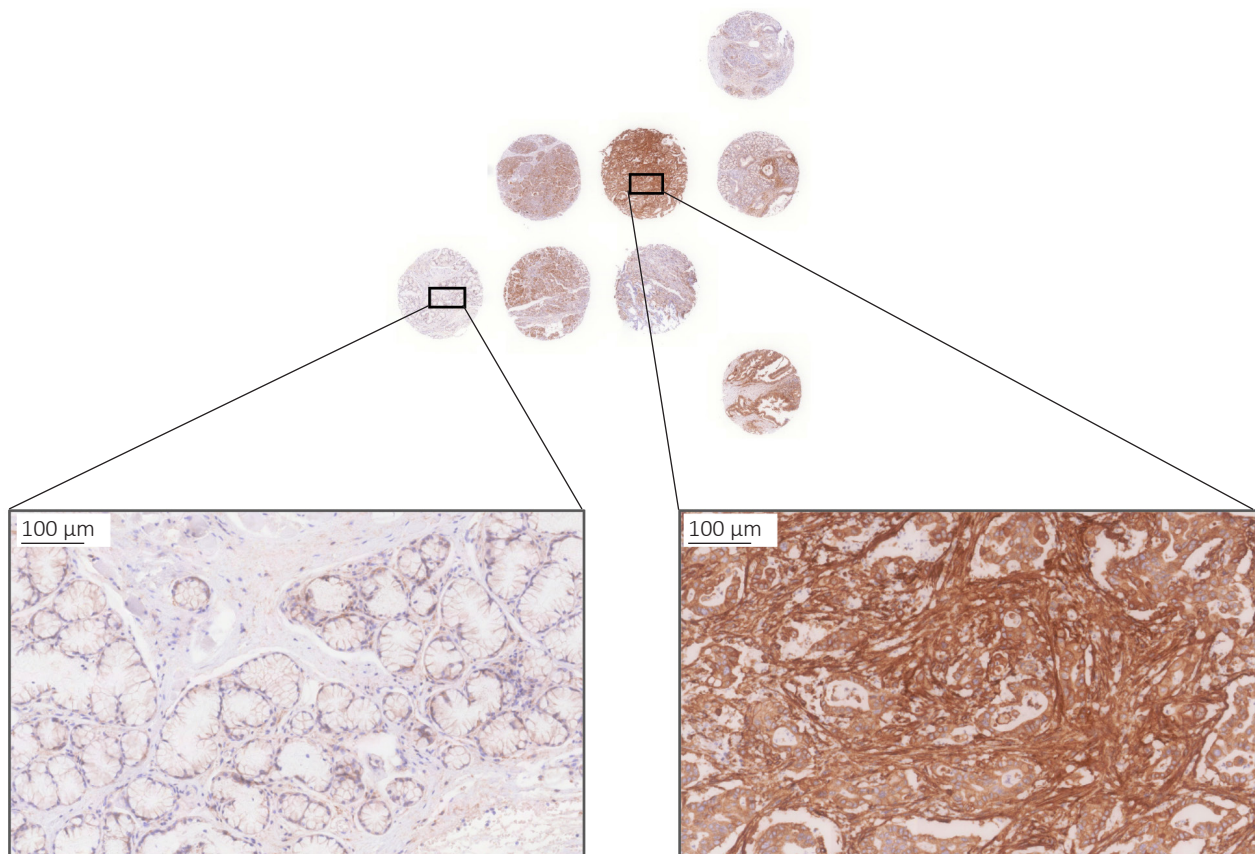


**Figura 34.** Estudio de inmunohistoquímica de los tumores xenografts heterotópicos subcutáneos de CAPAN-2 por LEM 2/15 (marrón). En la sección superior se puede observar la distribución de la MT1-MMP fundamentalmente en el borde del tumor (escala: 1000 µm), y en la sección inferior se muestra una ampliación (escala: 50 µm).

## 6. Modelos animales ortotópicos de adenocarcinoma ductal pancreático

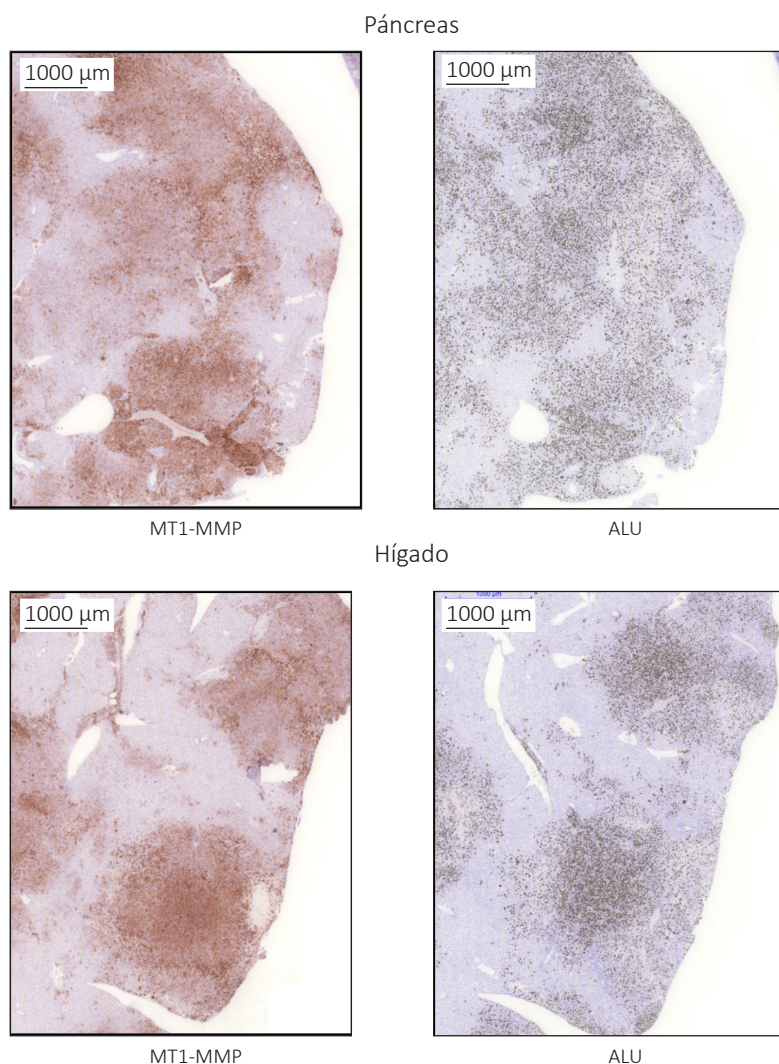
### 6.1. Selección del xenoinjerto de PDAC

La expresión de MT1-MMP en varias muestras derivadas de pacientes de PDAC de la colección de modelos del Dr. Hidalgo (CNIO) se evaluó mediante inmunohistoquímica con LEM 2/15 con el fin de establecer los modelos xenograft ortotópicos PDX. Tal como se observa en la figura 35, las muestras varían considerablemente en cuanto a su expresión de MT1-MMP, seleccionándose la muestra PANC 198 como aquella con mayor expresión y, por tanto, adecuada para el desarrollo de los modelos PDX.



**Figura 35.** Inmunohistoquímica de diversas muestras de adenocarcinomas ductales de páncreas de pacientes, utilizando LEM 2/15 como agente de tinción para evaluar la expresión de MT1-MMP. A la derecha se observa la tinción de la muestra PANC198, positiva para la metaloproteasa, frente a una muestra de páncreas de un paciente sano (a la izquierda).

Una vez establecido el modelo PDX, se valoró si producía metástasis en ratones NSG. Para ello, se realizó una inmunohistoquímica con LEM 2/15 (para reconocer la expresión de MT1-MMP) en secciones de páncreas e hígado (órgano en el que se esperaban metástasis) y con una sonda anti-ALU (ALU es un fragmento de ADN presente en el genoma de los primates) para reconocer la procedencia humana de las células en cuestión (figura 36). Los resultados confirmaron que la expresión de MT1-MMP se correspondía con células tumorales humanas tanto en el páncreas como en las metástasis hepáticas.

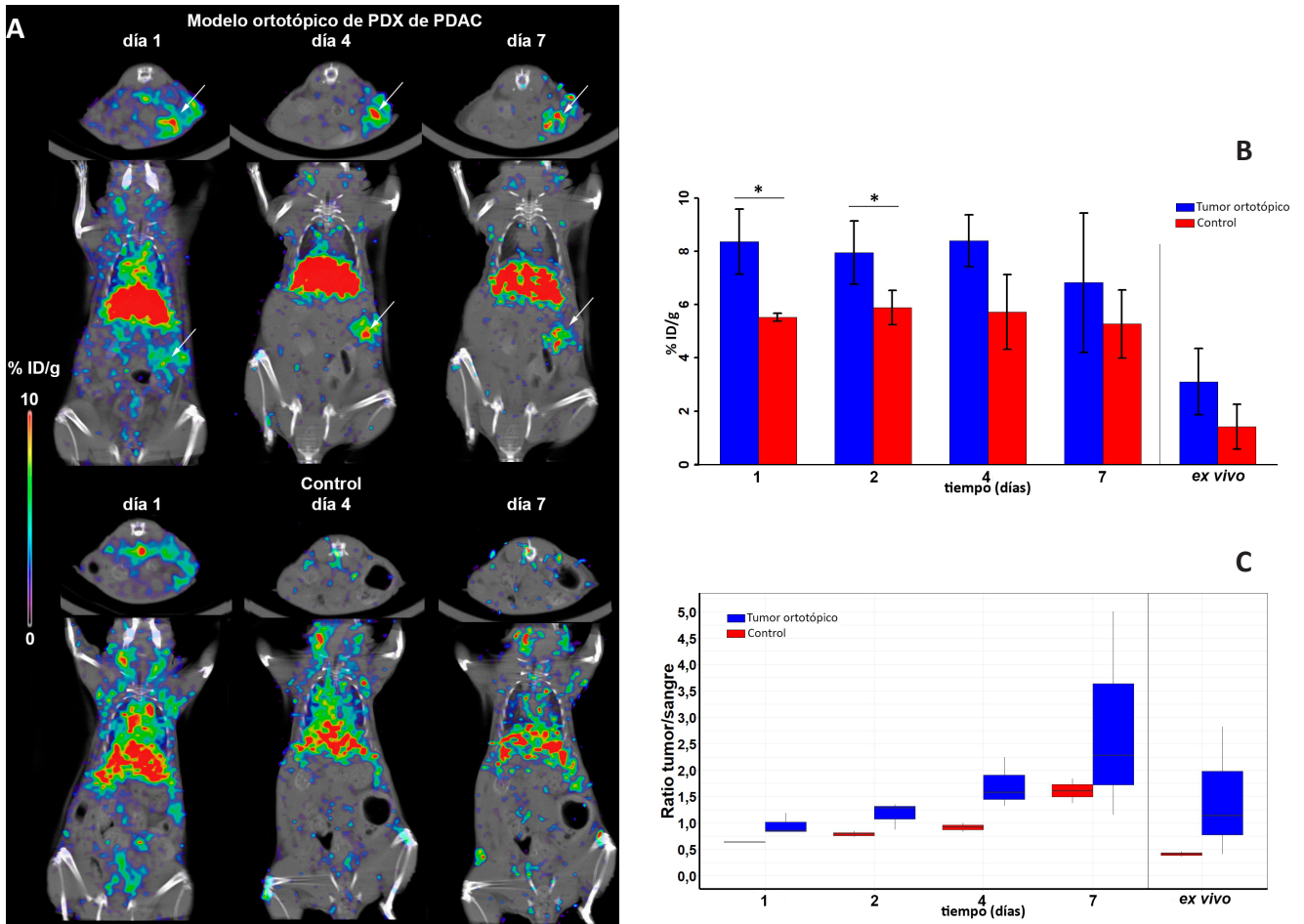


**Figura 36.** Análisis de la expresión de MT1-MMP en ratones xenograft metastásicos para PDAC. (Arriba) Sección de un tumor PDAC con potencial metastásico implantado ortotópicamente en ratones hembras NSG. La presencia de células tumorales humanas se visualiza fácilmente en el tejido del ratón mediante la sobreexpresión de MT1-MMP (izquierda) y su colocalización con el marcador humano (derecha). (Abajo) Sección de hígado marcada con sonda ALU (derecha) y LEM 2/15 (izquierda). Escala: 1000 µm.

## 6.2. Modelo derivado del tumor de un paciente (grupo 7)

### 6.2.1. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15

El anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 se inyectó tanto en ratones que portaban el tumor ortotópico PDAC de origen humano como en ratones sin tumor (control), monitorizando durante 7 días su biodistribución mediante PET. El análisis de las imágenes PET de los ratones PDX mostró una señal clara e inequívoca en la zona del páncreas a diferencia de los ratones control, donde delimitar el páncreas fue una tarea ardua al no diferenciarse con el CT de otros tejidos blandos (figura 37 A). La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue mayor en los animales con tumor ( $8,39 \pm 1,22$ ,  $7,97 \pm 1,19$ ,  $8,42 \pm 0,98$  y  $6,84 \pm 2,62$  % ID/g a los 1, 2, 4 y 7 días, respectivamente) que en los animales control ( $5,54 \pm 0,15$ ,  $5,91 \pm 0,65$ ,  $5,74 \pm 1,40$  y  $5,29 \pm 1,28$  % ID/g a los 1, 2, 4 y 7 días, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas durante los primeros días posinyección (figura 37 B). La ratio tumor/sangre de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en los ratones con tumor ( $0,85 \pm 0,36$ ,  $1,29 \pm 0,48$ ,  $1,58 \pm 0,92$  y  $2,28 \pm 3,85$  a los 1, 2, 4 y 7 días, respectivamente) fue superior a los animales sin tumor ( $0,64 \pm 0,01$ ,  $0,79 \pm 0,08$ ,  $0,92 \pm 0,12$  y  $1,61 \pm 0,33$  a los 1, 2, 4 y 7 días, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas a 1 y 4 días posinyección (figura 37 C). La captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en los animales PDX de PDAC ( $12,86 \pm 2,17$ ,  $13,34 \pm 2,25$ ,  $13,35 \pm 2,80$  y  $12,51 \pm 3,00$  % ID/g a los 1, 2, 4 y 7 días, respectivamente) fue ligeramente superior a la encontrada en los ratones control ( $9,39 \pm 1,20$ ,  $9,29 \pm 0,94$ ,  $8,82 \pm 0,99$  y  $8,51 \pm 0,14$  % ID/g a los 1, 2, 4 y 7 días, respectivamente), con diferencias no significativas desde el punto de vista estadístico.



**Figura 37.** Estudios de microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en un modelo ortotópico de un PDX de PDAC ( $n = 3$ ) y animales control ( $n = 2$ ). **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) de ratones portadores de un tumor ortotópico (mitad superior) o control (mitad inferior) a los 1, 5 y 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Estudio cuantitativo de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (% ID/g) en modelos ortotópicos y animales control a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección, además de *ex vivo* el 7 día. **C.** Ratio tumor/sangre a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección, además de *ex vivo* el 7 día. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

El valor de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en el páncreas del modelo PDX, estimado tras el análisis de las imágenes PET, es superior al obtenido en el contador gamma ( $6,84 \pm 2,62$  frente a  $3,12 \pm 1,25$  % ID/g, respectivamente); este resultado es consecuencia de la contribución que tiene la elevada señal observada en el hígado en la cuantificación del páncreas dada su proximidad en la imagen PET (tabla 15). De igual forma sucede en los ratones sanos, donde la captación en el páncreas obtenida por PET es considerablemente mayor a la obtenida tras biodistribución *ex vivo* ( $5,29 \pm 1,28$  frente a  $1,43 \pm 0,84$  % ID/g, respectivamente). Estos resultados sugieren que los valores de captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 obtenidos en el páncreas mediante PET estén sobrevalorados, hecho que se manifiesta en mayor grado en los ratones sanos; así, mientras que la relación PET/*ex vivo* es 2,2 veces en ratones PDX, esta es de 3,7 en ratones sanos. La captación hepática del radiotrazador determinada *ex vivo* fue muy similar a la obtenida mediante PET tanto en los ratones PDX ( $13,83 \pm 4,42$  y  $12,51 \pm 3,00$  % ID/g, respectivamente) como en los control ( $8,76 \pm 0,44$  y  $8,51 \pm 0,14$  % ID/g, respectivamente). Al igual que en el modelo de GBM, se pudo calcular el porcentaje de dosis inyectada que se acumuló en el hígado al séptimo día de la inyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. La acumulación fue superior en los ratones PDX ( $17,47 \pm 2,96$  % ID) en comparación con los animales control ( $10,25 \pm 2,09$  % ID), aunque sin diferencias estadísticamente significativas. No obstante, dicha acumulación fue similar a la observada en el grupo de GBM (alrededor del 16 % de la dosis

inyectada). Es interesante remarcar que hubo un ratón PDX de PDAC que no se utilizó en los datos porque mostró una captación hepática inusualmente alta (43,30 % ID/g y 44,28 % ID a los 7 días *ex vivo*) con una menor actividad en sangre (0,15 % ID/ml frente a  $3,15 \pm 1,79$  % ID/g para el resto de ratones PDX de PDAC a los 7 días *ex vivo*).

**Tabla 15.** Estudio de biodistribución *ex vivo* y PET a los 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 de ratones PDX de PDAC (n = 3) y control (n = 2). Los valores vienen dados por el % ID/g

Órgano	PDX		CONTROL	
	<i>ex vivo</i>	PET	<i>ex vivo</i>	PET
Sangre	$3,15 \pm 1,79$	$2,84 \pm 0,89$	$3,36 \pm 1,45$	$3,44 \pm 1,50$
Corazón	$1,83 \pm 0,44$	-	$1,65 \pm 0,13$	-
Pulmón	$2,26 \pm 0,55$	-	$2,98 \pm 0,55$	-
Hígado	$13,83 \pm 4,42$	$12,51 \pm 3,00$	$8,76 \pm 0,84$	$8,51 \pm 0,14$
Bazo	$5,52 \pm 1,68$	$4,92 \pm 0,33$	$5,79 \pm 0,86$	$4,08 \pm 0,87$
Riñones	$9,97 \pm 11,91$	$2,70 \pm 0,36$	$3,58 \pm 0,33$	$2,27 \pm 0,33$
Músculo	$0,61 \pm 0,21$	$0,51 \pm 0,43$	$0,95 \pm 0,29$	$0,83 \pm 0,17$
Grasa	$0,86 \pm 0,66$	-	$1,60 \pm 0,65$	-
Hueso	$2,58 \pm 0,42^{**}$	$0,95 \pm 0,34^{**}$	$3,67 \pm 0,97$	$0,87 \pm 0,17$
Estómago	$1,02 \pm 0,60$	-	$1,53 \pm 0,31$	-
Intestino	$0,89 \pm 0,27$	-	$0,92 \pm 0,13$	-
Páncreas	$3,12 \pm 1,25$	$6,84 \pm 2,62$	$1,43 \pm 0,84$	$5,29 \pm 1,28$
Cerebro	$0,14 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,31$	$0,13 \pm 0,05$	$0,57 \pm 0,36$
Plasma	$6,12 \pm 4,36$	-	$5,14 \pm 2,28$	-

Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 6.2.2. Farmacocinética

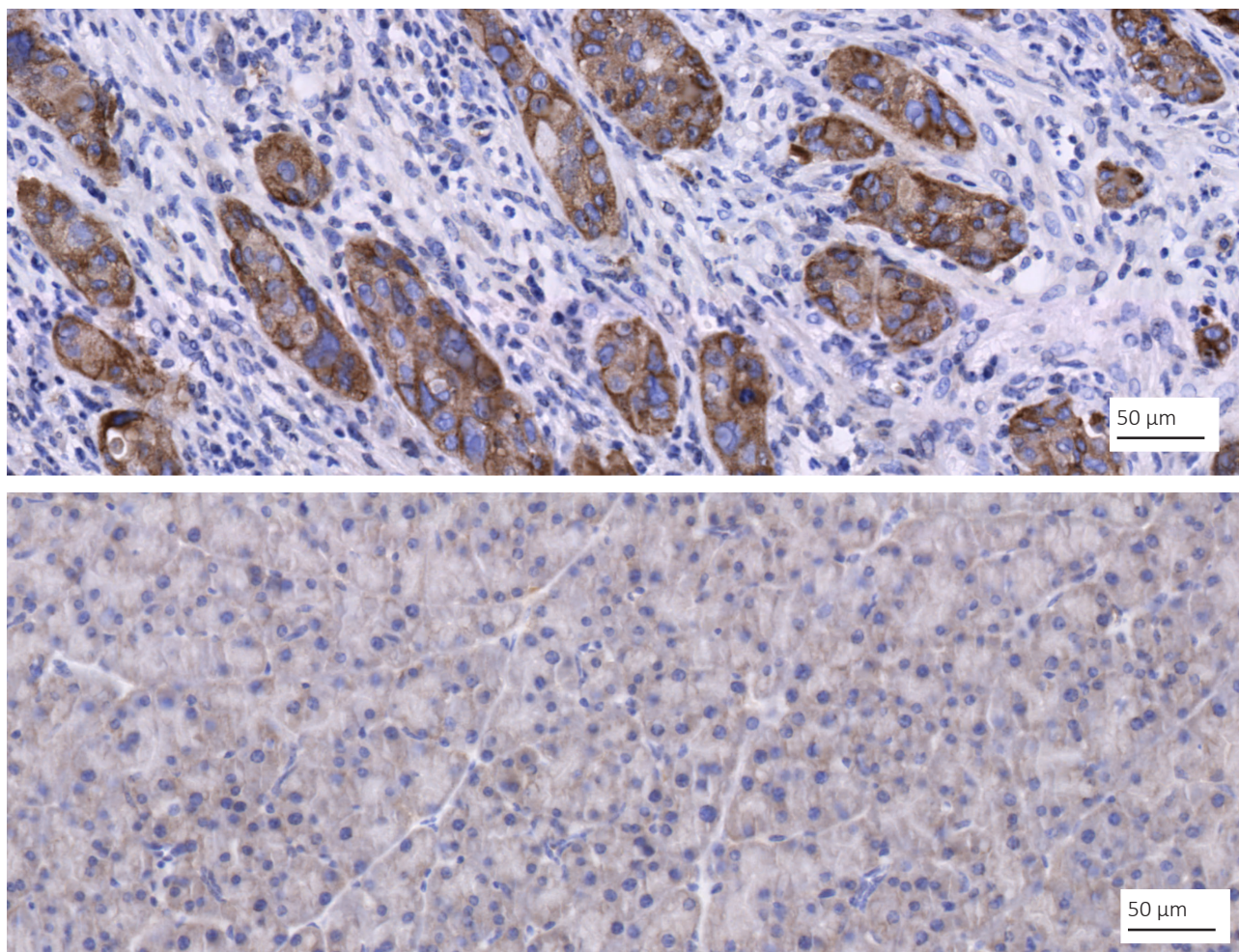
El análisis farmacocinético de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 de los animales PDX y control no mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto al valor de los parámetros farmacocinéticos (tabla 16). Además, se obtuvieron valores muy similares a los encontrados en el modelo de PDAC utilizando la línea CAPAN-2 (tabla 14), lo cual pone de manifiesto que la farmacocinética del anticuerpo LEM 2/15 no se ve modificada en estos modelos animales.

**Tabla 16.** Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal PDX de PDAC (n = 3) y grupo control (n = 2) tras la inyección de 20 µg de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos

	Kel (d-1)	t <sub>1/2</sub> (d)	AUC <sub>0-∞</sub> (% ID*d/g)	MRT (d)	Cl (ml/d)	Vss (ml)
<b>Tumor</b>	0,19 ± 0,05	4,25 ± 0,91	131,86 ± 26,56	6,04 ± 1,27	0,76 ± 0,23	4,54 ± 0,16
<b>Control</b>	0,17 ± 0,056	4,74 ± 2,27	144,93 ± 54,20	6,77 ± 3,22	0,74 ± 0,28	4,58 ± 0,51

### 6.2.3. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica con LEM 2/15 de las secciones de páncreas de ratones PDX evidenció la clara expresión de MT1-MMP en las células tumorales de origen humano (figura 38 A), a diferencia de los páncreas de los ratones control donde no se visualizó la metaloproteasa (figura 38 B). Las células tumorales de origen humano se diferenciaron bien de las células de ratón por su mayor tamaño.

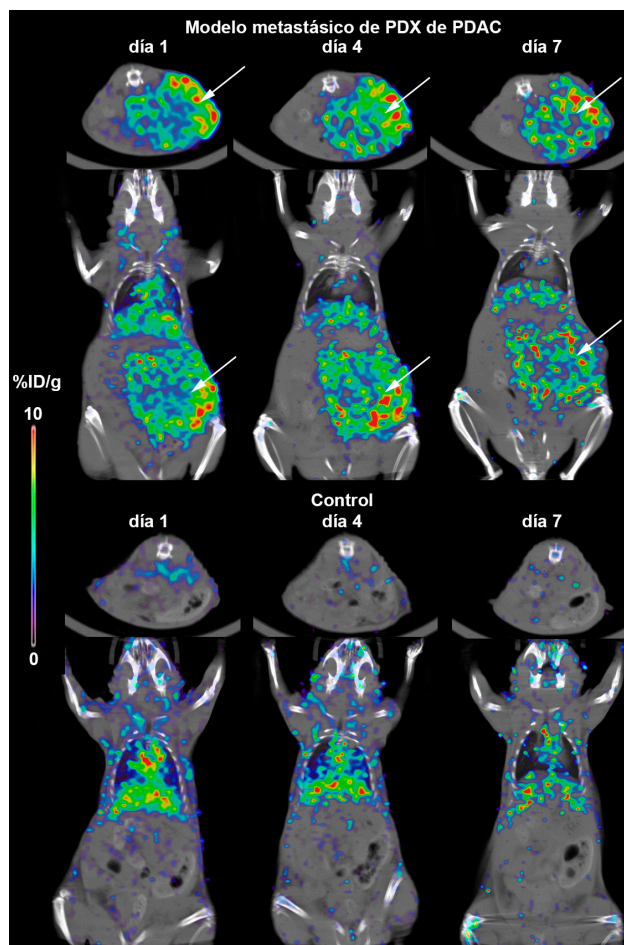


**Figura 38.** Análisis de la expresión de MT1-MMP en ratones PDX y control mediante inmunohistoquímica con LEM 2/15. **A.** Tejido de tumor implantado en el páncreas de un roedor donde se observa la expresión de MT1-MMP en células tumorales (marrón). **B.** Páncreas de un ratón control. Escala: 50 µm.

### 6.3. Modelo metastásico (grupo 8)

#### 6.3.1. Imagen microPET/CT de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15

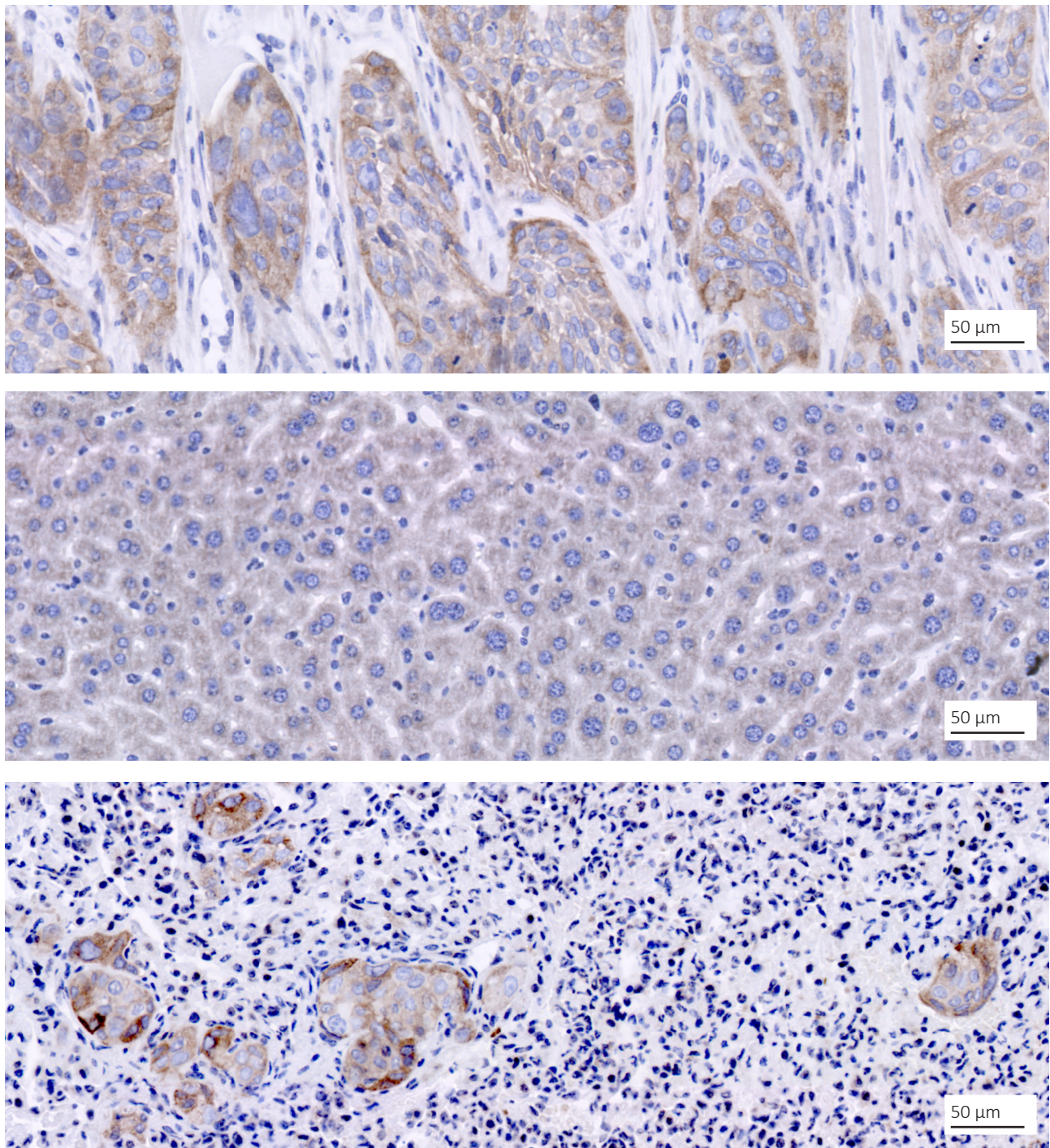
El radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 se administró a ratones NGS, los cuales tienen la capacidad de desarrollar metástasis cuando se les implantan tumores de páncreas de origen humano. La elevada mortalidad de estos ratones, observada ya al primer día posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, permitió monitorizar solamente un animal tanto del modelo metastásico como del control. La imagen PET mostró claras diferencias en la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en la zona abdominal entre el animal portador del tumor y el control (figura 39). Los resultados de la cuantificación de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en la zona abdominal en el modelo de tumor metastásico (5,7, 7,11, 5,97 y 5,98 % ID/g a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección) fueron muy superiores a los del ratón control (1,63, 1,53, 1,27 y 0,97 % ID/g a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección). La ratio tumor/sangre del modelo de metástasis (0,96, 1,60, 1,61 y 3,71 a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección) fue muy superior a la analizada en el animal control (0,17, 0,20, 0,17 y 0,15 a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección). Respecto a las metástasis, no se encontraron en las imágenes PET indicios en los órganos donde se esperaban observar, tales como hígado y pulmón.



**Figura 39.** Estudios de microPET/CT con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en un modelo de metástasis de un tumor derivado de un paciente con PDAC (mitad superior) y en un ratón control NSG (mitad inferior). Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) de un modelo de metástasis en ratón o control a los 1, 5 y 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Los tumores están marcados con flechas.

#### 6.3.2. Inmunohistoquímica

La evaluación de la expresión de MT1-MMP con LEM 2/15 mediante inmunohistoquímica en el ratón PDX metastásico mostró que el tumor desarrollado en la zona abdominal, de gran tamaño, expresaba claramente MT1-MMP (figura 40 A). Mientras que en el tejido hepático no se encontraron metástasis (figura 40 B), en el pulmón se visualizaron pequeños grupos de células metastásicas que expresaban MT1-MMP (figura 40 C) y, que debido a su pequeño tamaño (inferiores en todos los casos a 0,5 mm de diámetro), no pudieron ser detectados mediante PET. Los resultados muestran que la MT1-MMP se expresa tanto en el tumor primario como en las metástasis que comienzan a desarrollarse en el pulmón.



**Figura 40.** Análisis de la expresión de MT1-MMP mediante inmunohistoquímica con LEM 2/15 en el modelo metastásico de PDX. **A.** Tejido de tumor implantado en el páncreas de un roedor donde puede observarse la expresión de MT1-MMP (marrón). **B.** Tejido de hígado. **C.** Tejido de pulmón donde puede observarse la expresión de MT1-MMP en pequeñas metástasis. Escala: 50 µm.



# DISCUSIÓN

---

El glioblastoma y el adenocarcinoma ductal de páncreas son, actualmente, dos de los tumores con mayor mortalidad que existen a pesar de los avances tanto del diagnóstico como del tratamiento oncológico durante las últimas décadas<sup>171,207</sup>. La mejora del diagnóstico en estas patologías, junto con un mayor conocimiento de su fisiología, podría ayudar no solo en la selección y monitorización del tratamiento sino también en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que podrían incrementar las tasas de supervivencia de los pacientes. En este sentido, una herramienta diagnóstica que aportara mayor sensibilidad, especificidad y exactitud en la detección de este tipo de tumores sería clave en la práctica clínica. Hoy en día, buena parte de la toma de decisiones en oncología se basan en el uso de técnicas de imagen no invasivas como la CT, la MRI o la PET. La MRI es la técnica de referencia en el diagnóstico del GBM, aunque tiene sus limitaciones en cuanto a la identificación del grado del tumor, dificultad para determinar la cantidad de células tumorales infiltradas entre el tejido cerebral y problemas al diferenciar el tumor del resto de tejidos debido a los cambios inducidos por el tratamiento (pseudoprogresión y pseudorespuesta)<sup>172</sup>. En lo que respecta al PDAC, la técnica de referencia, la CT, también presenta limitaciones tales como una escasa sensibilidad para detectar tumores pequeños y metástasis en los nódulos linfáticos, además de poca exactitud en la detección de metástasis hepáticas pequeñas y peritoneales<sup>210-212</sup>. Las técnicas de referencia pueden complementarse con la PET en el diagnóstico de ambos tipos de tumores. La <sup>18</sup>F-FDG tiene una utilidad limitada en el diagnóstico del GBM, debido al elevado consumo de glucosa por parte del cerebro, por lo que se han descrito otros radiotrazadores que muestran un gran potencial para el diagnóstico de este tipo de tumores cerebrales, por ejemplo, la <sup>11</sup>C-MET, la <sup>18</sup>F-FET, la <sup>18</sup>F-FLT o la <sup>18</sup>F-FMISO<sup>176-194</sup>. La combinación de la CT con la PET utilizando <sup>18</sup>F-FDG es una herramienta sensible para la detección de PDAC, aunque tiene poca sensibilidad para la localización de metástasis en los nódulos linfáticos y en el peritoneo<sup>214,216</sup>. La utilización de otros radiotrazadores en el diagnóstico de PDAC, como la <sup>18</sup>F-FLT, tiene un uso muy limitado<sup>242</sup>. Con todo lo anterior en mente, el desarrollo de nuevos radiotrazadores o radiofármacos que puedan dar nueva información acerca del desarrollo, antes y durante el tratamiento, de estos tumores podría incrementar el éxito de las terapias contra el cáncer. En este sentido, la inmunoPET es una técnica emergente que aúna la especificidad de los anticuerpos por antígenos concretos y la sensibilidad de la PET<sup>20</sup>. Asimismo, los anticuerpos monoclonales son una de las principales herramientas utilizadas en la inmunoterapia, por lo que esta técnica también puede utilizarse para la selección de la terapia más adecuada y su seguimiento<sup>243,244</sup>.

La utilidad de MT1-MMP como biomarcador de GBM ha sido descrita por varios investigadores del CNIO así como en otros estudios<sup>71-77</sup>. El análisis bioinformático de la base de datos REMBRANDT confirmó la correlación positiva entre el aumento de la expresión de MT1-MMP con los grados tumorales avanzados, malignidad y corta tasa de supervivencia general del paciente de GBM (anexo 2). Asimismo, varios estudios han señalado que la MT1-MMP también podría ser una diana interesante para el diagnóstico de PDAC<sup>78,209</sup>.

Este trabajo describe el desarrollo de un radiotrazador basado en la detección cuantitativa de la expresión de MT1-MMP a través de la inmunoPET, siendo la primera tesis publicada en España sobre este tema. Una vez elegida la diana, el mAb de origen murino LEM 2/15 se seleccionó por su alta especificidad, así como por sus posibles propiedades terapéuticas al inhibir la actividad colagenasa de MT1-MMP, y se marcó con el radionúclido <sup>89</sup>Zr<sup>158,159</sup>. Posteriormente, algunas propiedades importantes en el diseño de radiotrazadores basados en anticuerpos tales

como el número de quelantes por anticuerpo, su estabilidad e inmunoreactividad se evaluaron *in vitro*. Por último, la sonda  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 se evaluó *in vivo* en modelos animales de cáncer (GBM y PDAC) en un escáner microPET/CT.

## 1. Radioquímica

El número de moléculas de agente quelante (deferoxamina) que se unieron por cada molécula de anticuerpo (LEM 2/15) fue del orden de 2-3, no afectando a la inmunoreactividad del anticuerpo, tal como se demostró mediante citometría de flujo. El rendimiento radioquímico y la actividad específica del radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fueron acordes a los resultados encontrados en otros trabajos de inmunoPET<sup>59,245-248</sup>. El mismo protocolo de conjugación con DFO y marcaje con  $^{89}\text{Zr}$  aplicado a un anticuerpo inespecífico comercial (IgG<sub>1</sub>) resultó, en algunos casos, en un peor rendimiento radioquímico y, por tanto, en su actividad específica; no obstante, el radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG<sub>1</sub> obtenido permitió realizar estudios de imagen molecular en condiciones similares a los realizados con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. La pureza radioquímica media final de ambos radiotrazadores, estudiada mediante ITLC, fue mayor del 97 %, dentro del rango descrito en otros trabajos<sup>245-249</sup>.

La incubación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG durante 7 días en suero humano reveló la alta estabilidad de ambos radiotrazadores, tanto a 4 °C como a 37 °C, acorde con lo establecido previamente<sup>26,250</sup>. Sin embargo, esta fue inferior al incubar ambos radiotrazadores en plasma humano a 37 °C. La utilización de plasma sanguíneo para el estudio de la estabilidad *in vitro* es más real que el uso de suero. Esta pérdida de estabilidad podría explicar en gran parte el aumento de la captación de  $^{89}\text{Zr}$  de manera inespecífica por parte del hueso a lo largo de los experimentos<sup>251</sup>.

## 2. Estudios en modelos animales xenografts heterotópicos subcutáneos de glioblastoma multiforme

Los primeros experimentos con el radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 se realizaron en modelos animales xenograft heterotópicos subcutáneos de GBM. La biodistribución *ex vivo* (grupo 1) del  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM a lo largo de 7 días en ratones portadores de tumores U251 y MCF7 mostró una disposición del anticuerpo en el organismo similar a la descrita en otros trabajos de inmunoPET<sup>64,252,253</sup>. El tumor derivado de la línea celular U251 (expresa MT1-MMP) mostró una captación significativamente mayor a los dos primeros días que el tumor control MCF7 (MT1-MMP negativo). Sin embargo, no se observó un incremento significativo de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 durante los 7 días del experimento en los tumores U251, sino más bien al contrario, una tendencia a disminuir con el tiempo. Este resultado contrasta con los datos obtenidos en otros trabajos de inmunoPET en los que el complejo radiotrazador-proteína diana sufre un proceso de internalización y, por tanto, de residualización del  $^{89}\text{Zr}$  en el interior de la célula, el cual se refleja en un incremento de la captación en el tiempo<sup>64,254-256</sup>. Asimismo, resaltar que, aunque en menor grado que en los tumores U251, la captación en los tumores derivados de la línea MCF7 fue superior a otros tejidos; este fenómeno se puede explicar por el efecto EPR, caracterizado por una neovascularización tumoral que difiere de la de los tejidos sanos (vasos sanguíneos irregulares, con células endoteliales con grandes fenestraciones), y que le confiere mayor permeabilidad a los componentes del plasma sanguíneo, junto con un retorno venoso lento y un pobre aclaramiento linfático, lo que produce una mayor acumulación de

grandes macromoléculas (como los anticuerpos) en el espacio intersticial de la masa tumoral<sup>257</sup>. Igualmente, la acumulación del anticuerpo en los tumores U251 debida a la unión específica a su diana se verá favorecida por el propio efecto EPR en dicha masa tumoral. No obstante, el efecto EPR de dos líneas de cáncer cuyo origen es muy diferente (U251, tumor cerebral, y MCF7, cáncer de mama) puede ser dispar<sup>258</sup>. Además de la acumulación en ambos tumores, los órganos que más captación del radiotrazador presentaron fueron el hígado y el bazo. Asimismo, solo un tejido, hueso, mostró un incremento a lo largo del tiempo (de  $1,72 \pm 0,20$  a  $3,53 \pm 1,06$  % ID/g a los 1 y 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, respectivamente). La acumulación de  $^{89}\text{Zr}$  en hueso, especialmente en los lugares donde la formación es más activa como la epífisis, ha sido descrita por diversos estudios y es debida a cierta inestabilidad *in vivo* del complejo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO<sup>251-253,259</sup>. Un aspecto interesante que se deriva de los estudios de biodistribución es la posibilidad de estimar la dosis de radiación que recibirían aquellos tejidos/órganos con un mayor acúmulo del anticuerpo en aquellos pacientes que recibieran un anticuerpo marcado con  $^{89}\text{Zr}$ . En este sentido, el hígado, órgano donde se acumula aproximadamente el 16 % de la dosis inyectada, y el hueso (en torno al 9 % de la dosis inyectada a los 7 días posinyección del trazador) serían los más comprometidos.

Los animales del grupo 1 inyectados con el radiotrazador, además de la biodistribución *ex vivo*, también fueron monitorizados por un escáner microPET/CT. En este estudio se evidenciaron las diferencias en la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 entre U251 y MCF7 encontradas *ex vivo*. Sin embargo, la captación también evidenció una disminución estadísticamente significativa en el tiempo. Los resultados sugieren que otros procesos de la biología de la MT1-MMP, además de la propia internalización del complejo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15-MT1-MMP, pueden estar implicados en la captación tumoral del radiotrazador. Dichos procesos podrían abarcar desde el corte y liberación de ectodominios de la metaloproteasa anclada en la membrana plasmática hasta la propia regulación de su expresión en presencia del anticuerpo. La relación tumor/sangre se estudió para evaluar tanto la retención del radiotrazador en la masa tumoral como estimar el mejor tiempo al cual se podrían obtener imágenes con el mayor contraste posible. La relación se incrementó significativamente con el tiempo en ambos tipos de tumores, aunque dicho aumento fue mayor para U251 que para MCF7, indicando una retención específica para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15.

Dos modelos de xenograft heterotópicos a los que se les inyectó  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y el control  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica se desarrollaron con el fin de evaluar la captación de ambos radiotrazadores en el mismo tipo de tumor derivado de la línea U251 (grupo 2). Además, se utilizó también otro modelo de glioblastoma basado en las neuroesferas TS543 (grupo 3). Los ratones portadores de tumores U251 mostraron una disminución en la captación de ambos anticuerpos en el tiempo y una mayor captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en comparación con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG, aunque no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, la ratio tumor/sangre sí se incrementó durante el experimento y mostró una mayor retención de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 que del anticuerpo inespecífico. Asimismo, es interesante remarcar que los valores de captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (expresados como % de la dosis inyectada por gramo de masa tumoral) fueron muy similares para los modelos del grupo 1 y del grupo 2 en los cuales se inyectó una dosis mayor del radiotrazador (20  $\mu\text{g}$  y 65  $\mu\text{g}$ , respectivamente).

Los experimentos realizados con los animales portadores de TS543 solo se pudieron realizar hasta los 6 días debido a la alta tasa de mortalidad de este tipo de modelos de GBM. La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue ligeramente más alta que en el modelo de U251, resultado que contrasta con el hecho de que la línea celular TS543 expresa menos MT1-MMP que la línea U251 tal cual se demostró mediante citometría de flujo, no obstante, quizás sea debido a diferencias en la estructura vascular de ambos tumores y, por tanto, a diferencias en el efecto EPR<sup>258</sup>. La

captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 no solo fue mayor que la de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica, sino que a diferencia de los tumores U251, esta diferencia fue estadísticamente significativa a los 3 y 6 días. Sin embargo, aunque la ratio tumor/sangre aumentó a lo largo del tiempo, las diferencias únicamente fueron estadísticamente significativas al tercer día posinyección.

Finalmente, la captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica fue estimada mediante PET. En el modelo TS543 no se encontró ninguna diferencia entre ambos radiotrazadores, sin embargo, en los ratones portadores de U251 la captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue ligeramente mayor que para  $^{89}\text{Zr}$ -IgG inespecífica, con diferencias estadísticamente significativas solo al primer día posinyección. Un trabajo reciente en el que se evaluaba la influencia de fragmentos extracelulares solubles en sangre del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), ha comprobado que la inyección de bajas dosis del anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -imgatuzumab proporciona una mayor captación en tumores con un nivel medio de expresión de EGFR que en aquellos con mayores niveles de expresión, además de que estos últimos mostraron una captación hepática más elevada<sup>260</sup>.

El estudio por inmunohistoquímica confirmó la presencia de MT1-MMP en los tumores U251 y su ausencia en MCF7; además, permitió localizar la metaloproteasa en zonas específicas del tumor. La doble tinción con LEM 2/15 y un marcador de proliferación celular (Ki67) o un marcador endotelial (CD31) demostró la colocalización de MT1-MMP con las células tumorales (positivas a anti-Ki67); sin embargo, no se visualizó MT1-MMP en las células endoteliales (positivas a anti-CD31). Es interesante remarcar este último punto porque confirma que prácticamente toda la señal en PET sería derivada de la captación específica de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en las células tumorales. Además, este hallazgo indica que LEM 2/15 no tendría una reacción cruzada con la MT1-MMP de origen murino siendo muy específico de la versión humana de esta proteína. Por último, las autorradiografías mostraron que la radiactividad, es decir,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, se detectó en aquellas zonas del tumor que solapaban con las áreas de expresión de MT1-MMP.

### 3. Estudios en modelos animales ortotópicos de glioblastoma multiforme

La terapia e imagen basada en anticuerpos tiene problemas al aplicarse en las diversas enfermedades cerebrales debido a la poca permeabilidad para macromoléculas de la barrera hematoencefálica. Esta es una de las principales razones por las que las terapias sistémicas, que son efectivas en otros tipos de cáncer, han sido menos efectivas para tratar tumores cerebrales primarios y metastásicos<sup>261</sup>. Sin embargo, los gliomas de grado alto, como el GBM, pueden producir varias alteraciones en la vasculatura asociada al tumor, incluyendo la formación de fenestraciones, disrupción de las uniones estrechas, alteraciones en el espesor de la lámina basal subendotelial e incremento del espacio perivascular<sup>262</sup>. Asimismo, los tratamientos de primera línea para el GBM, los cuales incluyen resección quirúrgica y radioterapia, afectan a la integridad de la barrera hematoencefálica<sup>263,264</sup>. En este contexto la inmunoPET podría ser de gran utilidad en el diagnóstico en neuro-oncología ya que provee una mayor especificidad para distinguir las auténticas recurrencias tumorales de los efectos provocados por los tratamientos convencionales. Además, las técnicas de imagen molecular dirigidas a antígenos específicos de la superficie del tumor pueden dar auténtica información acerca del paisaje genético del tumor y la heterogeneidad de la distribución espacial de los biomarcadores tumorales. Por todo esto y dada la ausencia de la barrera hematoencefálica en los modelos animales xenografts heterotópicos subcutáneos de GBM, además de la poca semejanza de estos modelos a la realidad

clínica, se estudió la captación del radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en modelos animales ortotópicos de GBM utilizando la línea celular U251 (grupo 4) y la neuroesfera TS543 (grupo 5)<sup>265,266</sup>.

El estudio de imagen molecular mediante PET no permitió visualizar ninguna señal en el cerebro de los ratones del modelo ortotópico U251; además, los valores de la ratio tumor/sangre fueron muy inferiores a los calculados en los modelos heterotópicos. El modelo ortotópico de TS543 sí mostró una alta captación de los mAb radiomarcados (tanto  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 como  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos radiotrazadores. La ratio tumor/sangre en el modelo TS543 sí mostró un incremento en el tiempo para  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, a diferencia de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Las diferencias en la captación de los dos radiotrazadores por parte de ambos modelos hizo sospechar de variabilidad en la integridad de la barrera hematoencefálica debidas al desarrollo de los tumores. La inyección del colorante azul de Evans a los ratones ortotópicos portadores de los tumores además de a ratones control con/sin simulación de la cirugía de inoculación de las células tumorales en el cerebro, permitió demostrar que la integridad de la barrera hematoencefálica estuvo más comprometida en los ratones portadores de tumores TS543 que en los portadores de la línea U251.

La distribución de MT1-MMP en los cerebros de los ratones portadores de los tumores TS543 también se estudió mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo LEM 2/15. Además, al igual que en los modelos xenograft heterotópicos de U251, se utilizó una tinción para Ki67 y CD31. Los resultados confirmaron que la expresión de MT1-MMP colocalizaba con las células tumorales (positivas a anti-Ki67) y su ausencia en las células endoteliales (positivas a anti-CD31). Por tanto, como en el caso anterior, se confirmó que LEM 2/15 es un anticuerpo específico para la MT1-MMP humana. Por último, la expresión de MT1-MMP se correlacionó también con la señal de la actividad de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 obtenida mediante autorradiografía.

Estos experimentos demostraron la capacidad del radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 de penetrar a través de una barrera hematoencefálica alterada por el desarrollo de una masa tumoral en el cerebro de los animales.

## 4. Estudios en modelos animales de adenocarcinoma ductal pancreático

Una vez diagnosticado el PDAC, no existe ningún tratamiento eficaz, alcanzándose tasas de supervivencia menores al 25 % de los pacientes al cabo de los 5 años<sup>267</sup>. Los pacientes terminan falleciendo con una mediana de supervivencia de un año, aunque la quimioterapia con FOLFIRINOX (Irinotecán + Folinato + Oxaliplatino + Fluoruracilo infusional) o la combinación de gemcitabina y nab-paclitaxel han mejorado la supervivencia en comparación con la gemcitabina sola<sup>268</sup>. En la actualidad, la respuesta al tratamiento se realiza midiendo el tamaño del tumor mediante CT, además de otras técnicas, y no existe un biomarcador para predecir el efecto de la terapia de forma directa y precisa. En este marco, el aporte de una herramienta de imagen muy sensible y específica como la inmunPET, que pudiera aportar información del efecto prematuro del tratamiento en el metabolismo tumoral antes de producirse cambios morfológicos, sería de gran utilidad en clínica. Aunque algunos autores no consideran MT1-MMP como una diana prioritaria para el desarrollo de sondas de imagen o herramientas terapéuticas en PDAC,

su sobreexpresión parece contribuir a la resistencia a gemcitabina<sup>209,269</sup>. En este sentido, el desarrollo de una sonda de imagen dirigida MT1-MMP podría ayudar a elegir la terapia más eficaz para los pacientes. Además, la inhibición de MT1-MMP por parte de anticuerpos como LEM 2/15 podría utilizarse como herramienta terapéutica<sup>159</sup>. Con esto en mente, se amplió el estudio del radiotrazador <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 a modelos de PDAC, tanto xenograft heterotópicos como ortotópicos.

El radiotrazador <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 se inyectó en ratones portadores de tumores CAPAN-2 (grupo 6), utilizando también un grupo de animales a los cuales se les administró previamente una cantidad excesiva de LEM 2/15 con el fin de saturar el aclaramiento específico en el tumor (es decir, el mediado por la unión a MT1-MMP). Las imágenes PET no mostraron claras diferencias en la señal del radiotrazador en ambos grupos de animales, lo que sugiere que la mayor parte de la retención podría deberse al efecto EPR; no obstante, aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas todos los días del experimento, la captación fue ligeramente mayor en los animales inyectados únicamente con <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15, lo cual podría indicar cierto grado de especificidad por parte del radiotrazador. En cualquier caso, la captación obtenida a los 5 días en el tumor CAPAN-2 ( $6,97 \pm 1,11$  % ID/g, 20  $\mu$ g de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 en PET) dista bastante de la registrada por otro radiotrazador específico para otra diana, el marcador tumoral CA19.9 ( $25,8 \pm 4,4$  % ID/g, 30  $\mu$ g de <sup>89</sup>Zr-5B1 en *ex vivo*), en una reciente publicación de inmunoPET en cáncer de páncreas<sup>270</sup>. La ratio tumor/sangre también se incrementó en el tiempo siendo estadísticamente significativa a los días 5 y 7 posinyección. La captación hepática del radiotrazador mediante PET no mostró diferencias cuando se utilizó el anticuerpo en exceso para bloquear el aclaramiento específico. Una vez finalizados los experimentos de inmunoPET en el día 7, los ratones se exanguinaron, se sacrificaron y se diseccionaron para extraer sus órganos y medir la actividad mediante un contador gamma. Los valores reportados por el contador gamma, salvo en el cerebro, fueron más altos que los obtenidos mediante PET probablemente debido al efecto del volumen parcial, el cual infraestima la captación del radiotrazador en lesiones pequeñas y que ha sido reportado por otros autores<sup>223</sup>. Además, los valores fueron similares a los calculados en el modelo de U251 y MCF7 (grupo 1), inyectado también 20  $\mu$ g de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15. El estudio de inmunohistoquímica con LEM 2/15 en los tumores de células CAPAN-2 mostró una tenue expresión de MT1-MMP evidenciando que tal vez no era el modelo más adecuado para el estudio de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15, en comparación con los modelos anteriormente descritos. Es interesante remarcar que las áreas con mayor expresión de MT1-MMP se encontraron en los bordes de los tumores lo que, aparentemente, coincidía con la distribución heterogénea de la señal observada en las imágenes PET.

Los dos modelos animales ortotópicos de cáncer derivados de pacientes de PDAC fueron desarrollados para estudiar la distribución de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 en sistemas más reales, al igual que con GBM. En el primer modelo se implantó un xenoinjerto derivado de un paciente de PDAC en el páncreas de ratones *nude* (grupo 7), misma cepa que en el resto de la tesis doctoral. La imagen PET mostró una señal inequívoca en el área donde podría encontrarse el páncreas en comparación con los ratones control, donde no se apreció indicio de captación en esa zona. La delimitación del páncreas en los ratones control fue problemática debido a que el CT no genera imágenes de tejidos blandos con alto contraste entre ellos, dificultando una segmentación adecuada. En este sentido, la segmentación se ayudó de referencias anatómicas de varios órganos próximos (hígado, bazo y riñones), aunque parece conveniente que futuros estudios de cáncer de páncreas en modelos ortotópicos podrían beneficiarse si se usan agentes de contrastes yodados en el CT con el fin de delimitar los órganos de la masa abdominal con la mayor precisión posible. Tanto la captación como la ratio tumor/sangre del radiotrazador fueron superiores a los ratones control, aunque solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la captación a los dos primeros

días. La captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue mayor en los ratones PDX de PDAC que en los controles, sin encontrar diferencias estadísticas. Esta ausencia de significación estadística entre el modelo PDX de PDAC y los animales control probablemente sea debida al bajo número de individuos utilizados en este estudio. Los resultados encontrados por la biodistribución *ex vivo* confirmaron los encontrados tanto en el modelo xenograft heterotópico de GBM y MCF7 como de CAPAN-2.

Además, también se desarrolló un modelo PDX de PDAC en ratones NGS (grupo 8), animales con una inmunosupresión más severa que los animales utilizados hasta ahora y que, por tanto, tienen una mayor facilidad para formar metástasis<sup>271,272</sup>. El radiotrazador  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 solo se pudo estudiar en un animal PDX y en un animal control, debido a la alta mortalidad de los animales, sin embargo, los resultados fueron muy relevantes. El ratón portador del PDAC derivado de un paciente en el páncreas mostró, a diferencia del animal control, una gran masa tumoral en la cavidad abdominal en las imágenes PET además de una elevada captación y altas ratios tumor/sangre del radiotrazador. El estudio de la captación hepática de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 fue complicado en este animal debido a la amplia extensión del tumor dentro de la cavidad abdominal. No se encontraron metástasis mediante PET en hígado y en pulmón. En ambos modelos ortotópicos PDX de PDAC se confirmó la expresión de MT1-MMP mediante inmunohistoquímica en el tejido tumoral pancreático y su ausencia en el páncreas de los animales control. Asimismo, en el modelo de metástasis, aunque no se encontraron en hígado, sí se encontraron pequeños grupos de células metastásicas en el pulmón, cuyo tamaño estaba por debajo del límite de resolución del escáner PET.

## 5. Farmacocinética

Los anticuerpos del isotipo IgG, debido a su considerable tamaño, muestran un aclaramiento plasmático lento, una semivida de eliminación elevada y una distribución limitada en los tejidos del organismo. Tras una inyección intravenosa, el perfil farmacocinético sanguíneo presenta las características propias de un modelo bicompartimental, es decir, una fase de distribución rápida tras la inyección y, posteriormente, una fase caracterizada por una eliminación lenta<sup>36</sup>. Esta fase terminal pudo ser analizada en detalle, a partir de las imágenes PET y mediante un análisis no compartimental, en prácticamente todos los modelos animales empleados en esta tesis doctoral.

El análisis farmacocinético del anticuerpo  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, tras la inyección de 20  $\mu\text{g}$  por vía intravenosa, mostró que el aclaramiento plasmático fue lento (0,7-1 ml/día) y con una semivida de eliminación terminal alrededor de 4 días tanto en el modelo heterotópico de U251 como en los modelos CAPAN-2 y PDX ortotópicos. La administración de 65  $\mu\text{g}$  del anticuerpo en el modelo heterotópico de U251 resultó en un incremento no proporcional del área bajo la curva de los niveles plasmáticos, así como una disminución significativa del aclaramiento plasmático, típico de una cinética no lineal. El aclaramiento mediado por la diana o específico contribuye de manera significativa a la cinética de distribución y eliminación del anticuerpo<sup>34</sup>; así, para antígenos que se encuentran en la membrana plasmática (como sería el caso de MT1-MMP), la cinética típica de un anticuerpo es no lineal hasta que comienza a saturarse su unión a la diana. Por tanto, los resultados indican que, a las dosis utilizadas de LEM 2/15, su aclaramiento específico no se encuentra saturado. Asimismo, la farmacocinética de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica fue evaluada también en el modelo heterotópico de U251, obteniéndose valores muy similares de los parámetros farmacocinéticos a los estimados con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15.

## 6. Limitaciones y perspectivas

La evaluación de la inmunoreactividad del anticuerpo conjugado y marcado se realizó mediante citometría de flujo. Quizás también sería conveniente, en futuros estudios, confirmar los resultados obtenidos mediante ensayos en los que se pueda evaluar la inhibición de la actividad catalítica de la MT1-MMP tanto por LEM 2/15 como por el anticuerpo modificado (conjugado/marcado). Actualmente, existen kits comerciales que evalúan la actividad catalítica de MT1-MMP en diferentes condiciones; así, implementar dichos ensayos de forma rutinaria como control de calidad del radiotrazador obtenido aportaría una mayor robustez a futuros estudios de inmunoPET con LEM 2/15 y/o derivados<sup>273</sup>.

La inmunoPET combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de la PET, sin embargo, los anticuerpos intactos no son las mejores sondas de imagen molecular debido a su lento aclaramiento plasmático. En este sentido, una de las características que debe tener un radiotrazador ideal para PET es un aclaramiento rápido, a la par de una elevada captación tumoral, para conseguir un buen contraste de la imagen a ser posible durante el mismo día de la inyección<sup>274</sup>. Esta característica reduciría el tiempo de espera del paciente en el servicio de medicina nuclear y reduciría la dosis de radiación a la que se vería expuesto. Asimismo, el gran tamaño de los anticuerpos intactos también les impide atravesar la barrera hematoencefálica dificultando su aplicación generalizada en la detección de tumores en neuro-oncología<sup>261</sup>. Con esto en mente, la futura miniaturización de LEM 2/15 en fragmentos más pequeños tales como la Fab, mejoraría las propiedades farmacocinéticas logrando de esta manera imágenes a un tiempo más cercano al momento de la inyección del radiotrazador<sup>41,275</sup>. Además, gracias a la corta semivida biológica de estos fragmentos, en vez del marcaje con radiometales con un periodo de semidesintegración de varios días como en el caso del <sup>89</sup>Zr, podrían utilizarse otros radionúclidos como el <sup>68</sup>Ga y el <sup>44</sup>Sc (68 minutos y 4 horas de periodo, respectivamente). Estos emisores de positrones, a diferencia del utilizado en esta tesis, pueden ser producidos en generadores; estos sistemas de producción de radioisótopos son más económicos que los ciclotrones, facilitando su uso en un mayor número de centros de investigación y unidades de medicina nuclear<sup>276</sup>. Por último, además de la miniaturización, la aplicación de herramientas de ingeniería de proteínas encaminadas a atravesar la barrera hematoencefálica podría ayudar a generar una sonda molecular apropiada para el estudio y diagnóstico de cualquier tipo de tumor cerebral sin la necesidad de la alteración de esta<sup>277,278</sup>.

Un estudio sobre el efecto EPR en modelos animales con diferentes fenotipos de cáncer de próstata ha puesto de manifiesto la importancia de este fenómeno y la utilidad de emplear controles adecuados en este tipo de experimentos; los valores de captación inespecífica fueron similares en todos los modelos utilizados (5 % ID/g, aproximadamente, a las 20 horas posinyección)<sup>279</sup>. En este sentido, la captación de una IgG inespecífica marcada con <sup>89</sup>Zr utilizada como control en una línea celular de GBM (U87) ha registrado valores (11,5 ± 3,3 % ID/g a los 5 días posinyección) que se encuentran dentro del rango de captación específica-inespecífica de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 en los modelos de GBM investigados en esta tesis<sup>280</sup>.

La internalización del complejo formado por el radiotrazador unida a la proteína transmembrana diana y la consiguiente residualización del radioisótopo en el interior celular, suponen que la cantidad de <sup>89</sup>Zr que se acumula en el tumor (y, por tanto, la captación expresada en % ID/g tumor) debería incrementarse con el tiempo tal cual se ha descrito en otros trabajos<sup>64,254-256</sup>. Los resultados de la presente tesis doctoral, en lo que se refiere a la inmunohistoquímica, muestran que tanto los tumores de GBM como los de páncreas derivados de pacientes presentan una expresión considerable de MT1-MMP, no obstante, no se ha observado un incremento de la captación



tumoral del radiotrazador con el tiempo. Varios trabajos de inmunoPET han reportado cierta disparidad entre una alta expresión de su diana y la captación del radiotrazador<sup>260,281,282</sup>. La diana de <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15, MT1-MMP, es una enzima regulada por procesos de internalización, pero también lo está por muchos otros<sup>80</sup>. En este sentido, los mecanismos de corte y liberación tanto autocatalíticos como no-autocatalíticos pueden liberar fragmentos solubles de MT1-MMP que pueden contener el dominio catalítico donde reside el epítipo al que se une LEM 2/15<sup>114,155</sup>. De hecho, en pacientes de cáncer de mama se ha reportado un incremento de fragmentos de MT1-MMP solubles en sangre<sup>283</sup>. Varios autores consideran que estos fragmentos de proteína soluble, tanto en sangre como en el interior del tumor, podrían actuar como una “barrera” que afectaría a la distribución y eliminación de anticuerpos conjugados con toxinas o radionúclidos debido a que las dosis inyectadas son insuficientes para que puedan acceder al antígeno intacto que se encuentra en la membrana plasmática<sup>284,285</sup>. Un grupo de investigadores de la Universidad de Groningen, recientemente, ha estudiado el efecto que tienen los fragmentos solubles que contienen el epítipo al cual va dirigido el radiotrazador en los estudios de inmunoPET. Los resultados de este trabajo han demostrado que un tumor que sobreexpresaba una gran cantidad de EGFR tenía una mayor concentración de fragmentos solubles del mismo en sangre que otros tumores con una menor expresión. Asimismo, mientras que en los tumores con menor expresión de EGFR se obtenían las mejores imágenes a bajas dosis del radiotrazador <sup>89</sup>Zr-*imgatuzumab* (10 y 25 µg), en el tumor con mayor expresión, por lo tanto, mayor cantidad de fragmentos solubles en sangre, se necesitaban dosis en torno a 160 µg para obtener una imagen adecuada. Además, la comparación de la captación en el tumor con mayor expresión de EGFR entre una dosis de 10 µg de <sup>89</sup>Zr-*imgatuzumab* y una <sup>111</sup>In-IgG inespecífica arrojaba valores cercanos al 10 % ID/g, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos anticuerpos. La captación en los tumores que producían menos fragmentos solubles en sangre se incrementó en el tiempo, a todas las dosis estudiadas, indicando procesos de internalización y posterior residualización del radioisótopo, a diferencia de lo que reportaron a bajas dosis en el modelo con mayor cantidad de fragmentos solubles. Otro resultado interesante de este estudio fue observar que, en el modelo de cáncer con una elevada acumulación de fragmentos solubles, había un mayor aclaramiento de la actividad en la sangre y un aumento de captación en el hígado en comparación con los otros tumores<sup>260</sup>. Este trabajo podría ser un buen marco para interpretar los resultados encontrados en esta tesis doctoral abriendo las siguientes cuestiones para futuros trabajos con radiotrazadores basados en inmunoPET dirigidos a MT1-MMP u otras dianas:

1. Desarrollo de anticuerpos o sondas dirigidos a otros epítopos situados en zonas que no formen parte de los fragmentos solubles en sangre procedentes de las proteínas transmembrana diana, en este caso la región catalítica de MT1-MMP. En este sentido cabe señalar los trabajos del grupo de investigación de Hideo Saji con anticuerpos dirigidos al dominio de tipo hemopexina y a la región bisagra<sup>166-168</sup>. Si bien es cierto que los mecanismos de corte y liberación de fragmentos en MT1-MMP son complejos, dirigiéndolos a estos epítopos podrían evitarse, al menos, los producidos por procesos autocatalíticos.
2. Realizar estudios para valorar la existencia de fragmentos solubles en sangre y/o tumores que puedan estar actuando como barrera en la entrega de pequeñas dosis de anticuerpos.
3. Realizar estudios adicionales con <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM 2/15 y <sup>89</sup>Zr-DFO-IgG inespecífica en los modelos tumorales aquí descritos, pero con altas dosis de anticuerpo. En este sentido, con vistas a futuros estudios de inmunoPET, es muy recomendable efectuar experimentos de escalado de dosis para evaluar cómo estos radiotrazadores se comportan en el sistema de estudio.

# CONCLUSIONES

---

Este trabajo ha establecido la posibilidad de utilizar la inmunoPET dirigida a la metaloproteasa MT1-MMP como una herramienta diagnóstica en oncología. Las conclusiones que se derivan del presente trabajo son las siguientes:

1. La conjugación del anticuerpo monoclonal LEM 2/15 anti-MT1-MMP con un agente quelante (deferoxamina) y posterior marcaje con el emisor de positrones  $^{89}\text{Zr}$  no alteró la inmunoreactividad del anticuerpo. El radiotrazador obtenido,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15, presentó unas características radioquímicas adecuadas y una estabilidad óptima para ser utilizado en animales de experimentación.
2. Los estudios de biodistribución *ex vivo* y microPET/CT con modelos animales xenograft heterotópicos subcutáneos de GBM revelaron una alta captación tumoral del radiotrazador. La captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en tumores implantados en el cerebro se detectó mediante imagen PET en modelos animales xenograft ortotópicos que tenían alterada la integridad de su barrera hematoencefálica.
3. La inyección del radiotrazador en modelos de tumores de PDAC derivados de pacientes proporcionó una señal clara en imagen PET y elevada captación en la zona pancreática de los roedores.
4. La elevada expresión de MT1-MMP en los modelos experimentales de glioblastoma y cáncer de páncreas fue confirmada mediante inmunohistoquímica. Además, la distribución del radiotrazador en los tumores de glioblastoma fue corroborada mediante autorradiografía.
5. La farmacocinética de anticuerpos marcados con isótopos emisores de positrones puede ser realizada mediante imagen molecular PET.
6. Como línea de trabajo futuro se propone: (i) optimizar la farmacocinética del anticuerpo LEM 2/15 mediante su miniaturización y posterior marcaje con isótopos emisores de positrones con un periodo de semidesintegración más corto (tales como el  $^{68}\text{Ga}$  o  $^{44}\text{Sc}$ ) y (ii) evaluar el efecto de permeabilidad y retención de los anticuerpos y/o sus fragmentos en tumores sólidos así como la presencia de fragmentos solubles de la proteína diana en sangre, con el fin de establecer cómo pueden afectar a la distribución y aclaramiento del radiotrazador.

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Biomedical imaging. U.S. National Library of Medicine Collection Development Manual [en línea].
2. Cunha L, Horvath I, Ferreira S, Lemos J, Costa P, Vieira D *et al.* Preclinical imaging: an essential ally in modern biosciences. *Mol Diagn Ther* 2014; **18**: 153-73.
3. Koba W, Jelicks LA, Fine EJ. MicroPET/SPECT/CT imaging of small animal models of disease. *Am J Pathol* 2013; **182**: 319-24.
4. Willmann JK, van Bruggen N, Dinkelborg LM, Gambhir SS. Molecular imaging in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**: 591-607.
5. Martí-Bonmatí L, Sopena R, Bartumeus P, Sopena P. Multimodality imaging techniques. *Contrast Media Mol Imaging* 2010; **5**: 180-9.
6. Chatziioannou AF. Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002; **29**: 98-114.
7. Rowland DJ, Cherry SR. Small-animal preclinical nuclear medicine instrumentation and methodology. *Semin Nucl Med* 2008; **38**: 209-22.
8. Chakravarty R, Hong H, Cai W. Positron emission tomography image-guided drug delivery: current status and future perspectives. *Mol Pharm* 2014; **11**: 3777-97.
9. Histed SN, Lindenberg ML, Mena E, Turkbey B, Choyke PL, Kurdziel KA. Review of functional/anatomical imaging in oncology. *Nucl Med Commun* 2012; **33**: 349-61.
10. Ehman EC, Johnson GB, Villanueva-Meyer JE, Cha S, Leynes AP, Larson PEZ *et al.* PET/MRI: Where might it replace PET/CT? *J Magn Reson Imaging* 2017; doi: 10.1002/jmri.25711.
11. Jiang L, Tu Y, Shi H, Cheng Z. PET probes beyond <sup>18</sup>F-FDG. *J Biomed Res* 2014; **28**: 435-46.
12. Juweid ME, Cheson BD. Positron-emission tomography and assessment of cancer therapy. *N Engl J Med* 2006; **354**: 496-507.
13. Lewis DY, Soloviev D, Brindle KM. Imaging tumor metabolism using positron emission tomography. *Cancer J* 2015; **21**: 129-136.
14. Kayani I, Groves AM. <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose PET/CT in cancer imaging. *Clin Med* 2006; **6**: 240-4.

15. Kelloff GJ, Hoffman JM, Johnson B, Scher HI, Siegel BA, Cheng EY *et al.* Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development. *Clin Cancer Res* 2005; 2785-808.
16. Rohren EM, Turkington TG, Coleman RE. Clinical applications of PET in Oncology. *Radiology* 2004; **231**: 305-32.
17. Effert PJ, Bares R, Handt S, Wolff JM, Büll U, Jakse G. Metabolic imaging of untreated prostate cancer by positron emission tomography with 18fluorine-labeled deoxyglucose. *J Urol* 1996; **155**: 994-8.
18. Bos R, van Der Hoeven JJ, van Der Wall E, van Der Groep P, van Diest PJ, Comans EF *et al.* Biologic correlates of <sup>18</sup>fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 379-87.
19. Wu AM. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods* 2014; **65**: 139-147.
20. Marik J, Junutula JR. Emerging role of ImmunoPET in receptor targeted cancer therapy. *Curr Drug Deliv* 2011; **8**: 70-8.
21. Freise AC, Wu AM. In vivo imaging with antibodies and engineered fragments. *Mol Immunol* 2015; **67**: 142-52.
22. Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, Lewis JS. PET imaging with <sup>89</sup>Zr: from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol* 2013; **40**: 3-14.
23. Van Dongen GA, Huisman MC, Boellaard R *et al.* <sup>89</sup>Zr-immuno-PET for imaging of long circulating drugs and disease targets: why, how and when to be applied? *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2015; **59**: 18-38.
24. Börjesson PK, Jauw YW, Boellaard R, de Bree R, Comans EF, Roos JC *et al.* Performance of immuno-positron emission tomography with zirconium-89-labeled chimeric monoclonal antibody U36 in the detection of lymph node metastases in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 2133-40.
25. Börjesson PK, Jauw YW, de Bree R, Roos JC, Castelijns JA, Leemans CR *et al.* Radiation dosimetry of <sup>89</sup>Zr-labeled chimeric monoclonal antibody U36 as used for immuno-PET in head and neck cancer patients. *J Nucl Med* 2009; **50**: 1828-36.
26. Perk LR, Vosjan MJ, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE *et al.* p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010; **37**: 250-9.
27. Vosjan MJ, Perk LR, Visser GW, Budde M, Jurek P, Kiefer GE *et al.* Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc* 2010; **5**: 739-43.

28. Cañadas Castro M. Aspectos metodológicos para la evaluación de sistemas de tomografía por emisión de positrones empleando técnicas Montecarlo, protocolos estandarizados y diferentes trazadores [tesis doctoral]. Madrid: ETSI Telecomunicación, Universidad Politécnica de Madrid; 2012.
29. Kiessling F, Pichler BJ. *Small Animal Imaging. Basics and Practical Guide*. Berlín: Springer; 2011.
30. Goldman LW. Principles of CT and CT Technology. *J Nucl Med. Technol* 2007; **35**: 115-128.
31. Janeway CA, Walport M, Traves P. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*. Barcelona: Masson; 2000.
32. Kretschmer A, Schwanbeck R, Valerius T, Rösner T. Antibody isotypes for tumor immunotherapy. *Transfus Med Hemother* 2017; **44**: 320-326.
33. García Merino A. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología* 2011; **26**: 301-6.
34. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2008; **84**: 548-58.
35. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 2014; **5**: 520.
36. Kamath AV. Translational pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies. *Drug Discov Today Technol* 2016; **21-22**: 75-83.
37. Ferri N, Bellosta S, Baldessin L, Boccia D, Racagni G, Corsini A. Pharmacokinetics interactions of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res* 2016; **111**: 592-9.
38. Shah DK, Betts AM. Antibody biodistribution coefficients. *MAbs* 2013; **5**: 297-305.
39. Yasunaga M, Manabe S, Tsuji A, Furuta M, Ogata K, Koga Y *et al*. Development of antibody-drug conjugates using DDS and molecular imaging. *Bioengineering (Basel)* 2017; **4**: 78.
40. Pyzik M, Rath T, Lencer WI, Baker K, Blumberg RS. FcRn: The architect behind the immune and non-immune functions of IgG and albumin. *J Immunol* 2015; **194**: 4595-4603.
41. Wiehr S, Bühler P, Gierschner D, Wolf P, Rolle AM, Kesenheimer C *et al*. Pharmacokinetics and PET imaging properties of two recombinant anti-PSMA antibody fragments in comparison to their parental antibody. *Prostate* 2014; **74**: 743-55.
42. Wu AM. Engineered antibodies for molecular imaging of cancer. *Methods* 2014; **65**: 139-47.

43. Chakravarty R, Goel S, Cai W. Nanobody: the “magic bullet” for molecular imaging? *Theranostics* 2014; **4**: 386-98.
44. Schlyer DJ. PET tracers and radiochemistry. *Ann Acad Med Singap* 2004; **33**: 146-54.
45. Wu AM. Antibodies and antimatter: the resurgence of immuno-PET. *J Nucl Med* 2009; **50**: 2-5.
46. Conti M, Eriksson L. Physics of pure and non-pure positron emitters for PET: a review and a discussion. *EJNMMI Phys* 2016; **3**: 8.
47. Holland JP, Williamson MJ, Lewis JS. Unconventional nuclides for radiopharmaceuticals. *Mol Imaging* 2010; **9**: 1-20.
48. Jacobson O, Kiesewetter DO, Chen X. Fluorine-18 radiochemistry, labeling strategies and synthetic routes. *Bioconjug Chem* 2015; **26**: 1-18.
49. Lubberink M, Herzog H. Quantitative imaging of  $^{124}\text{I}$  and  $^{86}\text{Y}$  with PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; **38 Suppl 1**: S10-S18.
50. Knowles SM, Zettlitz KA, Tavaré R, Rochefort MM, Salazar FB, Stout DB *et al.* Quantitative ImmunoPET of prostate cancer xenografts with  $^{89}\text{Zr}$ - and  $^{124}\text{I}$ -labeled anti-PSCA A11 minibody. *J Nucl Med* 2014; **55**: 452-9.
51. Williams SP. Tissue distribution studies of protein therapeutics using molecular probes: molecular imaging. *AAPS J* 2012; **14**: 389-99.
52. García-Toraño E, Peyrés V, Roteta M, Sánchez-Cabezudo AI, Romero E, Martínez Ortega A. Standardisation and precise determination of the half-life of  $^{44}\text{Sc}$ . *Appl Radiat Isot* 2016; **109**: 314-8.
53. Martiniova L, Palatis LD, Etchebehere E, Ravizzini G. Gallium-68 in medical imaging. *Curr Radiopharm* 2016; **9**: 187-207.
54. Pruszyński M, Majkowska-Pilip A, Loktionova NS, Eppard E, Roesch F. Radiolabeling of DOTATOC with the long-lived positron emitter  $^{44}\text{Sc}$ . *Appl Radiat Isot* 2012; **70**: 974-9.
55. Romero E. Desarrollo de un generador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ . Aplicaciones del  $^{68}\text{Ga}$  en tomografía por emisión de positrones [tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2017.
56. Chain CY, Illanes L. Radiofármacos en medicina nuclear. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata; 2015.
57. Price TW, Greenman J, Stasiuk GJ. Current advances in ligand design for inorganic positron emission tomography tracers  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  and  $^{44}\text{Sc}$ . *Dalton Trans* 2016; **45**: 15702-24.

58. Martell AE, Smith RM. Critical stability constants. Nueva York: Plenum Press; 1982.
59. Perk LR, Visser OJ, Stigter-van Walsum M, Vosjan MJ, Visser GW, Zijlstra JM *et al.* Preparation and evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -Zevalin for monitoring of  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin biodistribution with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2006; **33**: 1337-45.
60. Meijs WE, Herscheid JD, Haisma HJ Pinedo HM. Evaluation of desferal as a bifunctional chelating agent for labeling antibodies with Zr-89. *Int J Rad Appl Instrum A* 1992; **43**: 1443-7.
61. Galanello R, Agus A, Campus S, Danjou F, Giardina PJ, Grady RW. Combined iron chelation therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2010; **1202**: 79-86.
62. Bauman A, Valverde IE, Fischer CA, Vomstein S, Mindt TL. Development of  $^{68}\text{Ga}$ - and  $^{89}\text{Zr}$ -Labeled Exendin-4 as potential radiotracers for the imaging of insulinomas by PET. *J Nucl Med* 2015 ; **56**: 1569-74.
63. Vosjan MJ, Perk LR, Roovers RC, Visser GW, Stigter-van Walsum M, van Bergen *et al.* Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor nanobody with  $^{68}\text{Ga}$  via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; **38**: 753-63.
64. Holland JP, Divilov V, Bander NH, Smith-Jones PM, Larson SM, Lewis JS.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-J591 for ImmunoPET of prostate-specific membrane antigen expression in vivo. *J Nucl Med* 2010; **51**: 1293-300.
65. Vugts DJ, Visser GWM, van Dongen GAMS.  $^{89}\text{Zr}$ -PET radiochemistry in the development and application of therapeutic monoclonal antibodies and other biologicals. *Curr Top Med Chem* 2013; **13**: 446-57.
66. Fischer G, Seibold U, Schirmacher R, Wängler B, Wängler C.  $^{89}\text{Zr}$ , a radiometal nuclide with high potential for molecular imaging with PET: chemistry, applications and remaining challenges. *Molecules* 2013; **18**: 6469-90.
67. Deri MA, Ponnala S, Kozlowski P, Burton-Pye BP, Cicek HT, Hu C *et al.* p-SCN-Bn-HOPO: A superior bifunctional chelator for  $^{89}\text{Zr}$  ImmunoPET. *Bioconjug Chem* 2015; **26**: 2579-91.
68. Verel I, Visser GW, Boellaard R, Stigter-van Walsum M, Snow GB, van Dongen GA.  $^{89}\text{Zr}$  Immuno-PET: comprehensive procedures for the production of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled monoclonal antibodies. *J Nucl Med* 2003; **44**: 1271-81.
69. Tinianow JN, Gill HS, Ogasawara A, Flores JE, Vanderbilt AN, Luis E *et al.* Site-specifically  $^{89}\text{Zr}$ -labeled monoclonal antibodies for ImmunoPET. *Nucl Med Biol* 2010; **37**: 289-97.
70. Zeglis BM, Mohindra P, Weissmann GI, Divilov V, Hilderbrand SA, Weissleder R *et al.* Modular strategy for the construction of radiometalated antibodies for positron emission tomography based on inverse electron demand Diels-Alder click chemistry. *Bioconjug Chem* 2011; **22**: 2048-59.

71. Van Meter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol* 2001; **53**: 213-35.
72. Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B. Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol* 1998; **153**: 429-37.
73. Ulasov I, Thaci B, Sarvaiya P, Yi R, Guo D, Auffinger B *et al.* Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas. *Cancer Med* 2013; **2**: 457-67.
74. Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *J Neurooncol* 2001; **53**: 187-202.
75. Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H *et al.* Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase. A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1996; **56**: 384-92.
76. Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, Wheal A, Yong VW, Forsyth PA *et al.* Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2003; **1**: 333-45.
77. Nakada M, Nakamura H, Ikeda E, Fujimoto N, Yamashita J, Sato H *et al.* Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *Am J Pathol* 1999; **154**: 417-28.
78. Ellenrieder V, Alber B, Lacher U, Hendler SF, Menke A, Boeck W *et al.* Role of MT-MMPs and MMP-2 in pancreatic cancer progression. *Int J Cancer* 2000; **85**: 14-20.
79. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E *et al.* A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994; **370**: 61-5.
80. Itoh Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. *Matrix Biol* 2015; **44-46**: 207-23.
81. Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999; **99**: 81-92.
82. Zhou Z, Apte SS, Soyninen R, Cao R, Baaklini GY, Rauser RW *et al.* Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4052-7.



83. Oblander SA, Zhou Z, Gálvez BG, Starcher B, Shannon JM, Durbeej M *et al.* Distinctive functions of membrane type 1 matrix-metalloprotease (MT1-MMP or MMP-14) in lung and submandibular gland development are independent of its role in pro-MMP-2 activation. *Dev Biol* 2005; **277**: 255-69.
84. Irie K, Komori K, Seiki M, Tsuruga E, Sakakura Y, Kaku T *et al.* Impaired alveolization in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP). *Med Mol Morphol* 2005; **38**: 43-6.
85. Evans BR, Mosig RA, Lobl M, Martignetti CR, Camacho C, Grum-Tokars V *et al.* Mutation of membrane type-1 metalloproteinase, MT1-MMP, causes the multicentric osteolysis and arthritis disease Winchester syndrome. *Am J Hum Genet* 2012; **91**: 572-6.
86. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; **69**: 562-73.
87. Vartak DG, Gemeinhart RA. Matrix metalloproteases: underutilized targets for drug delivery. *J Drug Target* 2007; **15**: 1-20.
88. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 1995; **375**: 244-7.
89. Cao J, Hymowitz M, Conner C, Bahou WF, Zucker S. The propeptide domain of membrane type 1-matrix metalloproteinase acts as an intramolecular chaperone when expressed in trans with the mature sequence in COS-1 cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 29648-53.
90. Pavlaki M, Cao J, Hymowitz M, Chen WT, Bahou W, Zucker S. A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2740-9.
91. Yana I, Weiss SJ. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 2387-2401.
92. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1803**: 3-19.
93. Gingras D, Bousquet-Gagnon N, Langlois S, Lachambre MP, Annabi B, Béliveau R. Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 2001; **507**: 231-6.
94. Sounni NE, Roghi C, Chabottaux V, Janssen M, Munaut C, Maquoi E *et al.* Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2004; **279**: 13564-74.

95. Sato T, del Carmen Ovejero M, Hou P, Heegaard AM, Kumegawa M, Foged NT, *et al.* Identification of the membranetype matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J Cell Sci* 1997; **110**(Pt 5): 589-96.
96. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, *et al.* Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001; **20**: 4782-93.
97. Itoh Y, Palmisano R, Anilkumar N, Nagase H, Miyawaki A, Seiki M. Dimerization of MT1-MMP during cellular invasion detected by fluorescence resonance energy transfer. *Biochem J* 2011; **440**: 319-26.
98. Nakahara H, Howard L, Thompson EW, Sato H, Seiki M, Yeh Y, *et al.* Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloproteinase docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 7959-64.
99. Poincloux R, Lizárraga F, Chavrier P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *J Cell Sci* 2009; **122**: 3015-24.
100. Remacle A, Murphy G, Roghi C. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Sci* 2003; **116**: 3905-16.
102. Wang X, Ma D, Keski-Oja J, Pei D. Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal. *J Biol Chem* 2004; **279**: 9331-6.
101. Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 2006; **206**: 1-8.
103. Albrechtsen R, Kveiborg M, Stautz D, Vikesa J, Noer JB, Kotzsh A, *et al.* ADAM12 redistributes and activates MMP-14, resulting in gelatin degradation, reduced apoptosis and increased tumor growth. *J Cell Sci* 2013; **126**: 4707-20.
104. Jiang A, Lehti K, Wang X, Weiss SJ, Keski-Oja J, Pei D. Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 13693-8.
105. Anilkumar N, Uekita T, Couchman JR, Nagase H, Seiki M, Itoh Y. Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration. *EASEB J* 2005; **19**: 1326-8.
106. Uekita T, Itoh Y, Yana I, Ohno H, Seiki M. Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity. *J Cell Biol* 2001; **155**: 1345-56.
107. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N *et al.* Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J* 2001; **20**: 4782-93.

- 
108. Itoh Y, Ito N, Nagase H, Seiki M. The second dimer interface of MT1-MMP, the transmembrane domain, is essential for proMMP-2 activation on the cell surface. *J Biol Chem* 2008; **283**: 13053-62.
  109. Knäuper V, Will H, López-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H *et al.* Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; **271**: 17124-31.
  110. Knäuper V, Bailey L, Worley JR, Soloway P, Patterson ML, Murphy G. Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13. *FEBS Lett* 2002; **532**: 127-30.
  111. Stanton H, Gavrilovic J, Atkinson SJ, d'Ortho MP, Yamada KM, Zardi L *et al.* The activation of proMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form. *J Cell Sci* 1998; **111**: 2789-98.
  112. Lehti K, Lohi J, Valtanen H, Keski-Oja J. Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface. *Biochem J* 1998; **334**: 345-53.
  113. Toth M, Hernández-Barrantes S, Osenkowski P, Bernardo MM, Gervasi DC, Shimura Y *et al.* Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme. *J Biol Chem* 2002; **277**: 26340-50.
  114. Cauwe B, van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; **42**: 113-185.
  115. Okada A, Bellocq J, Rouyer N, Chenard M, Rio M, Chambon P *et al.* Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2730-34.
  116. Zhai Y, Hotary KB, Nan B, Bosch FX, Muñoz N, Weiss SJ *et al.* Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. *Cancer Res* 2005; **65**, 6543-50.
  117. Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M *et al.* Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol.*, 2004; **167**, 769-81.
  118. Hotary K, Li XY, Allen E, Stevens SL, Weiss SJ. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 2006; **20**, 2673-86.
  119. Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *J Cell Biol* 2000; **149**: 1309-23.

120. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; **95**: 365-77.
121. Tsunetzuka Y, Kinoh H, Takino T, Watanabe Y, Okada Y, Shinagawa A *et al.* Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer Res* 1996; **56**: 5678-83.
122. Kadono Y, Shibahara K, Namiki M, Watanabe Y, Seiki M, Sato H. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is involved in the formation of hepatocyte growth factor/scatter factor-induced branching tubules in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **251**: 681-7.
123. Okada A, Tomasetto C, Lutz Y, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A. *J Cell Biol* 1997; **137**: 67-77.
124. Chun T-H, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell* 2006; **125**: 577-91.
125. Sakamoto T, Seiki M. Cytoplasmic tail of MT1-MMP regulates macrophage motility independently from its protease activity. *Genes Cells* 2009; **14**: 617-26.
126. Abe T, Mori T, Kohno K, Seiki M, Hayakawa T, Welgus HG *et al.* Expression of 72 kDa type IV collagenase and invasion activity of human glioma cells. *Clin Exp Metastasis* 1994; **12**: 296-04.
127. Toth M, Bernardo MM, Gervasi DC, Soloway PD, Wang Z, Bigg HF *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2. *J Biol Chem* 2000; **275**: 41415-23.
128. Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* 2005; **120**: 303-13.
129. Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, Weiss SJ. Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. *Cell* 2003; **114**: 33-45.
130. Nagase H, Visse R. Triple helicase activity and the structural basis of collagenolysis. En Parks WC, Mecham R, editores. Extracellular matrix degradation. Berlín: Springer; 2011. p. 95-122.
131. Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 2000; **148**: 615-24.

- 
132. Gilles C, Polette M, Coraux C, Tournier JM, Meneguzzi G, Munaut C *et al.* Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 2001; **114**: 2967-76.
  133. Schenk S, Hintermann E, Bilban M, Koshikawa N, Hojilla C, Khokha R *et al.* Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol* 2003; **161**: 197-209.
  134. Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, Wang SW, Mohanam S, Fuller GN *et al.* Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis* 1996; **14**: 35-42.
  135. Kajita M, Itoh Y, Chiba T, Mori H, Okada A, Kinoh H *et al.* Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; **153**: 893-904.
  136. Montgomery N, Hill A, McFarlane S, Neisen J, O'Grady A, Conlon S *et al.* CD44 enhances invasion of basal-like breast cancer cells by upregulating serine protease and collagen-degrading enzymatic expression and activity. *Breast Cancer Res* 2012; **14**: R84.
  137. Merzak A, Koocheckpour S, Pilkington GJ. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro. *Cancer Res* 1994; **54**: 3988-92.
  138. Marrero-Díaz R, Bravo-Cordero JJ, Megías D, García MA, Bartolomé RA, Teixido J *et al.* Polarized MT1-MMP-CD44 interaction and CD44 cleavage during cell retraction reveal an essential role for MT1-MMP in CD44-mediated invasion. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; **66**: 48-61.
  139. Belkin AM, Akimov SS, Zaritskaya LS, Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion. *J Biol Chem* 2001; **276**: 18415-22.
  140. Belkin AM, Zemskov EA, Hang J, Akimov SS, Sikora S, Strongin AY. Cell-surface-associated tissue transglutaminase is a target of MMP-2 proteolysis. *Biochemistry* 2004; **43**: 11760-9.
  141. Rozanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, Strongin AY. The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *J Biol Chem* 2004; **279**: 4260-8.
  142. Endo K, Takino T, Miyamori H, Kinsen H, Yoshizaki T, Furukawa M *et al.* Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration. *J Biol Chem* 2003; **278**: 40764-70.
  143. Su G, Blaine SA, Qiao D, Friedl A. Membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated stromal syndecan-1 shedding stimulates breast carcinoma cell proliferation. *Cancer Res* 2008; **68**: 9558-65.

144. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases, angiogenesis, and cancer: commentary re: A. C. Lockhart *et al.*, Reduction of wound angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2003; **9**: 551-4.
145. Deryugina EI, Quigley JP. Pleiotropic roles of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis: contrasting, overlapping and compensatory functions. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1803**: 103-20.
146. Löffek S, Zigrino P, Steiger J, Kurschat P, Smola H, Mauch C. Melanoma cell-derived vascular endothelial growth factor induces endothelial tubulogenesis within fibrin gels by a metalloproteinase-mediated mechanism. *Eur J Cell Biol* 2006; **85**: 1167-77.
147. Sounni NE, Paye A, Host L, Noël A. MT-MMPS as regulators of vessel stability associated with angiogenesis. *Front Pharmacol* 2011; **2**: 111.
148. Eisenach PA, Roghi C, Fogarasi M, Murphy G, English WR. MT1-MMP regulates VEGF-A expression through a complex with VEGFR-2 and Src. *J Cell Sci* 2010; **123**: 4182-93.
149. Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; **36**: 128-37.
150. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 442-54.
151. Illman SA, Lehti K, Keski-Oja J, Lohi J. Epilysin (MMP-28) induces TGF-beta mediated epithelial to mesenchymal transition in lung carcinoma cells. *J Cell Sci* 2006; **119**: 3856-65.
152. Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong S'T *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015; **527**: 472-6.
153. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 2015; **527**: 525-30.
154. Fields GB. New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol* 2015; **44-46**: 239-46.
155. Goldberg GI. Renaissance of MMPs as therapeutic targets? Maybe. *Structure* 2015; **23**: 6-7.
156. Turunen SP, Tatti-Bugaeva O, Lehti K. Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2017; **1864**: 1974-1988.
157. Knapinska AM, Estrada CA, Fields GB. The roles of matrix metalloproteinases in pancreatic cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017; **148**: 339-354.

158. Gálvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37491-500.
159. Udi Y, Grossman M, Solomonov I, Dym O, Rozenberg H, Moreno V *et al.* Inhibition mechanism of membrane metalloprotease by an exosite-swiveling conformational antibody. *Structure* 2015; **23**: 104-15.
160. Devy L, Huang L, Naa L, Yanamandra N, Pieters H, Frans N *et al.* Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 2009; **69**: 1517-1526.
161. Zucker S, Cao J. Selective matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors in cancer therapy: ready for prime time? *Cancer Biol Ther* 2009; **8**: 1-3.
162. Ager EI, Kozin SV, Kirkpatrick ND, Seano G, Kodack DP, Askoxylakis V *et al.* Blockade of MMP14 activity in murine breast carcinomas: implications for macrophages, vessels, and radiotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2015; **107**(4).
163. Ingvarsen S, Porse A, Erpicum C, Maertens L, Jürgensen HJ, Madsen DH *et al.* Targeting a single function of the multifunctional matrix metalloproteinase MT1-MMP: impact on lymphangiogenesis. *J Biol Chem* 2013; **288**: 10195-10204.
164. Shiryaev SA, Remacle AG, Golubkov VS, Ingvarsen S, Porse A, Behrendt N *et al.* A monoclonal antibody interferes with TIMP-2 binding and incapacitates the MMP-2-activating function of multifunctional, pro-tumorigenic MMP-14/MT1-MMP. *Oncogenesis*. 2013; **2**: e80.
165. Basu B, Correa de Sampaio P, Mohammed H, Fogarasi M, Corrie P, Watkins NA *et al.* Inhibition of MT1-MMP activity using functional antibody fragments selected against its hemopexin domain. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; **44**: 393-403.
166. Temma T, Sano K, Kuge Y, Kamihashi J, Takai N, Ogawa Y *et al.* Development of a radiolabeled probe for detecting membrane type-1 matrix metalloproteinase on malignant tumors. *Biol Pharm Bull* 2009; **32**: 1272-7.
167. Kondo N, Temma T, Shimizu Y, Watanabe H, Higano K, Takagi Y *et al.* Miniaturized antibodies for imaging membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancers. *Cancer Sci* 2013; **104**: 495-501.
168. Shimizu Y, Temma T, Hara I, Makino A, Kondo N, Ozeki E *et al.* In vivo imaging of membrane type-1 matrix metalloproteinase with a novel activatable near-infrared fluorescence probe. *Cancer Sci* 2014; **105**: 1056-62.
169. Ulasov I, Yi R, Guo D, Sarvaiya P, Cobbs C. The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1846**: 113-20.
170. Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM *et al.* Glioma. *Nature Reviews Disease Primers* 2015; **1**: nrdp201517.

171. Ostrom QT, Gittleman H, Xu J, Kromer C, Wolinsky Y, Kruchko C *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2009-2013. *Neuro-oncology* 2016; **18**: 1-75.
172. Keunen O, Taxt T, Grüner R, Lund-Johansen M, Tonn JC, Pavlin T *et al.* Multimodal imaging of gliomas in the context of evolving cellular and molecular therapies. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; **76**: 98-115.
173. Soeda A, Hara A, Kunisada T, Yoshimura S, Iwama T, Park DM. The evidence of glioblastoma heterogeneity. *Sci Rep* 2015; **5**: 7979.
174. Li Y, Ali S, Clarke J, Cha S. Bevacizumab in recurrent glioma: Patterns of treatment failure and implications. *Brain Tumor Res Treat* 2017; **5**: 1-9.
175. Zhu P, Du XL, Lu G, Zhu JJ. Survival benefit of glioblastoma patients after FDA approval of temozolomide concomitant with radiation and bevacizumab: A population-based study. *Oncotarget* 2017; **8**: 44015-31.
176. Gulyás B, Halldin C. New PET radiopharmaceuticals beyond FDG for brain tumor imaging. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2012; **56**: 173-90.
177. Zhuang H, Yu JQ, Alavi A. Applications of fluorodeoxyglucose-PET imaging in the detection of infection and inflammation and other benign disorders. *Radiol Clin North Am* 2005; **43**: 121-34.
178. Phelps ME, Mazziotta JC. Positron emission tomography: human brain function and biochemistry. *Science* 1985; **228**: 799-809.
179. Würker M, Herholz K, Voges J, Pietrzyk U, Treuer H, Bauer B *et al.* Glucose consumption and methionine uptake in low-grade gliomas after iodine-125 brachytherapy. *Eur J Nucl Med* 1996; **23**: 583-6.
180. Ricci PE, Karis JP, Heiserman JE, Fram EK, Bice AN, Drayer BP. Differentiating recurrent tumor from radiation necrosis: time for re-evaluation of positron emission tomography? *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; **19**: 407-13.
181. Langleben DD, Segall GM. PET in differentiation of recurrent brain tumor from radiation injury. *J Nucl Med* 2000; **41**: 1861-7.
182. Tanaka Y, Nariai T, Momose T, Aoyagi M, Maehara T, Tomori T *et al.* Glioma surgery using a multimodal navigation system with integrated metabolic images. *J Neurosurg* 2009; **110**: 163-72.
183. Grosu A-L, Weber WA, Riedel E, Jeremic B, Nieder C, Franz M *et al.* L-(methyl-11C) methionine positron emission tomography for target delineation in resected high-grade gliomas before radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; **63**: 64-74.



- 
184. Weber DC, Zilli T, Buchegger F, Casanova N, Haller G, Rouzaud M *et al.* [<sup>18</sup>F]Fluoroethyltyrosine-positron emission tomography-guided radiotherapy for high-grade glioma. *Radiat Oncol* 2008; **3**: 44.
  185. Veas H, Senthamizhchelvan S, Miralbell R, Weber DC, Ratib O, Zaidi H. Assessment of various strategies for <sup>18</sup>F-FET PET-guided delineation of target volumes in high-grade glioma patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; **36**: 182-93.
  186. Nariai T, Tanaka Y, Wakimoto H, Aoyagi M, Tamaki M, Ishiwata K *et al.* Usefulness of L-[methyl-<sup>11</sup>C]methionine-positron emission tomography as a biological monitoring tool in the treatment of glioma. *J Neurosurg* 2005; **103**: 498-507.
  187. Herholz K, Hölzer T, Bauer B, Schröder R, Voges J, Ernestus RI *et al.* <sup>11</sup>C-methionine PET for differential diagnosis of low-grade gliomas. *Neurology* 1998; **50**: 1316-22.
  188. Hustinx R, Pourdehnad M, Kaschten B, Alavi A. PET imaging for differentiating recurrent brain tumor from radiation necrosis. *Radiol Clin North Am* 2005; **43**: 35-47.
  189. Miyake K, Ogawa D, Okada M, Hatakeyama T, Tamiya T. Usefulness of positron emission tomographic studies for glioma. *Neurol Med Chir* 2016; **56**: 396-408.
  190. Floeth FW, Pauleit D, Wittsack HJ, Langen KJ, Reifenberger G, Hamacher K *et al.* Multimodal metabolic imaging of cerebral gliomas: positron emission tomography with [<sup>18</sup>F]fluoroethyl-L-tyrosine and magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 2005; **102**: 318-27.
  191. Hatakeyama T, Kawai N, Nishiyama Y, Yamamoto Y, Sasakawa Y, Ichikawa T *et al.* <sup>11</sup>C-methionine (MET) and <sup>18</sup>F-fluorothymidine (FLT) PET in patients with newly diagnosed glioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; **35**: 2009-17.
  192. Jacobs AH, Thomas A, Kracht LW, Li H, Dittmar C, Garlip G *et al.* <sup>18</sup>F-fluoro-L-thymidine and <sup>11</sup>C-methylmethionine as markers of increased transport and proliferation in brain tumors. *J Nucl Med* 2005; **46**: 1948-58.
  193. Rasey JS, Koh WJ, Evans ML, Peterson LM, Lewellen TK, Graham MM *et al.* Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; **36**: 417-28.
  194. Brown JM. Therapeutic targets in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; **49**: 319-26.
  195. Lampson LA. Monoclonal antibodies in neuro-oncology: Getting past the blood-brain barrier. *MAbs* 2011; **3**: 153-60.
  196. Cai W, Wu Y, Chen K, Cao Q, Tice DA, Chen X. In vitro and in vivo characterization of <sup>64</sup>Cu-labeled Abegrin, a humanized monoclonal antibody against integrin alpha v beta 3. *Cancer Res* 2006; **66**: 9673-81.

197. Yang Y, Hernandez R, Rao J, Yin L, Qu Y, Wu J *et al.* Targeting CD146 with a <sup>64</sup>Cu-labeled antibody enables in vivo ImmunoPET imaging of high-grade gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; **112**: E6525-E6534.
198. Hernández R, Sun H, England CG, Valdovinos HF, Barnhart TE, Yang Y *et al.* ImmunoPET imaging of CD146 expression in malignant brain tumors. *Mol Pharm* 2016; **13**: 2563-70.
199. Dijkers EC, Oude Munnink TH, Kosterink JG, Brouwers AH, Jager PL, de Jong JR *et al.* Biodistribution of <sup>89</sup>Zr-trastuzumab and PET imaging of HER2-positive lesions in patients with metastatic breast cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2010; **87**: 586-92.
200. Den Hollander MW, Bensch F, Glaudemans AW, Oude Munnink TH, Enting RH, den Dunnen WF *et al.* TGF- $\beta$  antibody uptake in recurrent high-grade glioma imaged with <sup>89</sup>Zr-fresolimumab PET. *J Nucl Med* 2015; **56**: 1310-4.
201. Jansen MH, Veldhuijzen van Zanten SEM, van Vuurden DG *et al.* Molecular drug imaging: <sup>89</sup>Zr-bevacizumab PET in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Nucl Med* 2017; **58**:711-6.
202. Jansen MH, Lagerweij T, Sewing AC, Vugts DJ, van Vuurden DG, Molthoff CF *et al.* Bevacizumab targeting diffuse intrinsic pontine glioma: results of <sup>89</sup>Zr-bevacizumab PET imaging in brain tumor models. *Mol Cancer Ther* 2016; **15**: 2166-74.
203. Chakravarty R, Goel S, Valdovinos HF, Hernández R, Hong H, Nickles RJ *et al.* Matching the decay half-life with the biological half-life: ImmunoPET imaging with <sup>44</sup>Sc-labeled cetuximab Fab fragment. *Bioconjug Chem* 2014; **25**: 2197-204.
204. Garg PK, Garg S, Bigner DD, Zalutsky MR. Localization of fluorine-18-labeled Mel-14 monoclonal antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment in a subcutaneous xenograft model. *Cancer Res* 1992; **52**: 5054-60.
205. Scialpi M, Reginelli A, D'Andrea A, Gravante S, Falcone G, Baccari P *et al.* Pancreatic tumors imaging: An update. *Int J Surg* 2016; **28 Suppl 1**: S142-S155.
206. Fogel EL, Shahda S, Sandrasegaran K, DeWitt J, Easler JJ, Agarwal DM *et al.* A Multidisciplinary approach to pancreas cancer in 2016: A review. *Am J Gastroenterol* 2017; **112**: 537-54.
207. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; **63**: 11-30.
208. Binenbaum Y, Na'ara S, Gil Z. Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resist Updat* 2015; **23**: 55-68.
209. Dangi-Garimella S, Krantz SB, Barron MR, Shields MA, Heiferman MJ, Grippo PJ *et al.* Three-dimensional collagen I promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer through MT1-MMP-mediated expression of HMGA2. *Cancer Res* 2011; **71**: 1019-28.

- 
210. Wong JC, Lu DS. Staging of pancreatic adenocarcinoma by imaging studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008; **6**: 1301-8.
  211. Tsunoda T, Yamamoto Y, Kimoto M, Imai H, Iwamoto S, Kawasaki S *et al.* Staging and treatment for patients with pancreatic cancer. How small is an early pancreatic cancer? *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; **5**: 128-32.
  212. Tamm EP, Balachandran A, Bhosale PR, Katz MH, Fleming JB, Lee JH *et al.* Imaging of pancreatic adenocarcinoma: update on staging/resectability. *Radiol Clin North Am* 2012; **50**: 407-28.
  213. Sahani DV, Bonaffini PA, Catalano OA, Guimaraes AR, Blake MA. State-of-the-art PET/CT of the pancreas: current role and emerging indications. *Radiographics* 2012; **32**: 1133-1160.
  214. Paspulati RM, Gupta A. PET/MR imaging in cancers of the gastrointestinal tract. *PET Clin* 2016; **11**: 403-23.
  215. Herrmann K, Erkan M, Dobritz M, Schuster T, Siveke JT, Beer AJ *et al.* Comparison of 3'-deoxy-3'-[<sup>18</sup>F] fluorothymidine positron emission tomography (FLT PET) and FDG PET/CT for the detection and characterization of pancreatic tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; **39**: 846-51.
  216. Kauhanen SP, Komar G, Seppänen MP, Dean KI, Minn HR, Kajander SA *et al.* A prospective diagnostic accuracy study of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography, multidetector row computed tomography, and magnetic resonance imaging in primary diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Ann Surg* 2009; **250**: 957-63.
  217. Asagi A, Ohta K, Nasu J, Tanada M, Nadano S, Nishimura R *et al.* Utility of contrast-enhanced FDG-PET/CT in the clinical management of pancreatic cancer: impact on diagnosis, staging, evaluation of treatment response, and detection of recurrence. *Pancreas* 2013; **42**: 11-9.
  218. Jahromi AH, Sangster G, Zibari G, Martin B, Chu Q, Takalkar A *et al.* Accuracy of multi-detector computed tomography, fluorodeoxyglucose positron emission tomography-CT, and CA 19-9 levels in detecting recurrent pancreatic adenocarcinoma. *JOP* 2013; **14**: 466-8.
  219. Kersting S, Roth J, Bunk A. Transabdominal contrast-enhanced ultrasonography of pancreatic cancer. *Pancreatol* 2011; **11 Suppl 2**: 20-7.
  220. Frilling A, Sotiropoulos GC, Radtke A, Malago M, Bockisch A, Kuehl H *et al.* The impact of <sup>68</sup>Ga-DOTATOC positron emission tomography/computed tomography on the multimodal management of patients with neuroendocrine tumors. *Ann Surg* 2010; **252**: 850-6.
  221. Ambrosini V, Campana D, Nanni C, Cambioli S, Tomassetti P, Rubello D *et al.* Is <sup>68</sup>Ga-DOTA-NOC PET/CT indicated in patients with clinical, biochemical or radiological suspicion of neuroendocrine tumour? *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; **39**: 1278-83.

222. Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Nagatsu K, Koizumi M, Ukai Y *et al.* Preclinical evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled human antitransferrin receptor monoclonal antibody as a PET probe using a pancreatic cancer mouse model. *Nucl Med Commun* 2015; **36**: 286-94.
223. Sugyo A, Tsuji AB, Sudo H, Nagatsu K, Koizumi M, Ukai Y *et al.* Evaluation of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled human anti-CD147 monoclonal antibody as a positron emission tomography probe in a mouse model of pancreatic cancer. *PLoS One* 2013; **8**: e61230.
224. Viola-Villegas NT, Rice SL, Carlin S, Wu X, Evans MJ, Sevak KK *et al.* Applying PET to broaden the diagnostic utility of the clinically validated CA19.9 serum biomarker for oncology. *J Nucl Med* 2013; **54**: 1876-82.
225. England CG, Hernández R, Eddine SBZ, Cai W. Molecular imaging of pancreatic cancer with antibodies. *Mol Pharm* 2016; **13**: 8-24.
226. IAEA. Clinical translation of radiolabelled monoclonal antibodies and peptides. Viena: IAEA Publishing Section; 2009.
227. Squatrito M, Vanoli F, Schultz N, Jasin M, Holland EC. 53BP1 is a haploinsufficient tumor suppressor and protects cells from radiation response in glioma. *Cancer Res* 2012; **72**: 5250-60.
228. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF *et al.* CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med* 2013; **19**: 1264-72.
229. Evans MJ, Holland JP, Rice SL, Doran MG, Cheal SM, Campos C *et al.* Imaging tumor burden in the brain with  $^{89}\text{Zr}$ -transferrin. *J Nucl Med* 2013; **54**: 90-5. pmid: 23236019.
230. Steel CD, Stephens AL, Hahto SM, Singletary SJ, Ciavarrá RP. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Anim* 2008; **37**: 26-32.
231. Canadas M, Embid M, Lage E, Desco M, Vaquero JJ, Pérez JM. NEMA NU 4-2008 performance measurements of two commercial small-animal PET scanners: ClearPET and rPET-1. *IEEE Trans Nucl Sci* 2011; **58**: 58-65.
232. Loening AM, Gambhir SS. AMIDE: a free software tool for multimodality medical image analysis. *Mol Imaging* 2003; **2**: 131-7.
233. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC *et al.* User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 2006; **31**: 1116-28.
234. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* 2010; **99**: 306-14.
235. Rosenbaum SE (editor). Basic pharmacokinetic and pharmacodynamic. S. l: Jossey-Bass; 2011.

- 
236. Berrozpe JD, Lanao JM, Delfina JMP. Biofarmacia y farmacocinética, vol. 1. Madrid: Síntesis; 1997.
237. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods* 2011; **195**: 206-10.
238. Pérez AG. Estadística aplicada con R. Madrid: UNED; 2008.
239. González CG. Gráficos estadísticos y mapas con R. Madrid: Díaz de Santos; 2012.
240. Van Meir EG (editor). CNS Cancer models, markers, prognostic factors, targets, and therapeutic approaches. Nueva York: Humana Press; 2009.
241. Brown RP, Delp MD, Lindstedt SL, Rhomberg LR, Beliles RP. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health* 1997; **13**: 407-84.
242. Lamarca A, Asselin MC, Manoharan P, McNamara MG, Trigonis I, Hubner R, Saleem A, Valle JW. <sup>18</sup>F-FLT PET imaging of cellular proliferation in pancreatic cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; **99**: 158-69.
243. Redman JM, Hill EM, AlDeghather D, Weiner LM. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer. *Mol Immunol* 2015; **67**: 28-45.
244. McKnight BN, Viola-Villegas NT. <sup>89</sup>Zr-ImmunoPET companion diagnostics and their impact in clinical drug development. *J Labelled Comp Radiopharm* 2018; doi: 10.1002/jlcr.3605.
245. Ogasawara A, Tinianow JN, Vanderbilt AN, Gill HS, Yee S, Flores JE *et al.* ImmunoPET imaging of phosphatidylserine in pro-apoptotic therapy treated tumor models. *Nucl Med Biol* 2013; **40**: 15-22.
246. Perk LR, Stigter-van Walsum M, Visser GW, Kloet RW, Vosjan MJ, Leemans CR *et al.* Quantitative PET imaging of Met-expressing human cancer xenografts with <sup>89</sup>Zr-labelled monoclonal antibody DN30. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; **35**: 1857-67.
247. Dijkers EC, Kosterink JG, Rademaker AP, Perk LR, van Dongen GA, Bart J *et al.* Development and characterization of clinical-grade <sup>89</sup>Zr-trastuzumab for HER2/neu ImmunoPET imaging. *J Nucl Med* 2009; **50**: 974-81.
248. Holland JP, Caldas-Lopes E, Divilov V, Longo VA, Taldone T, Zatorska D *et al.* Measuring the pharmacodynamic effects of a novel Hsp90 inhibitor on HER2/neu expression in mice using Zr-DFO-trastuzumab. *PLoS One* 2010; **25**: e8859.
249. Chang AJ, Desilva R, Jain S, Lears K, Rogers B, Lapi S. <sup>89</sup>Zr-radiolabeled trastuzumab imaging in orthotopic and metastatic breast tumors. *Pharmaceuticals (Basel)* 2012; **5**: 79-93.

250. Sharma SK, Sevak KK, Monette S, Carlin SD, KnightJC, Wuest FR *et al.* Preclinical  $^{89}\text{Zr}$  immuno-PET of high-grade serous ovarian cancer and lymph node metastasis. *J Nucl Med* 2016; **57**: 771-776.
251. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. In vivo biodistribution and accumulation of  $^{89}\text{Zr}$  in mice. *Nucl Med Bio* 2011; **38**: 675-81.
252. Yuan Q, Furukawa T, Tashiro T, Okita K, Jin ZH, Aung W *et al.* Immuno-PET imaging of HER3 in a model in which HER3 signaling plays a critical role. *PLoS One*; 2015; **10**: e0143076.
253. Nagengast WB, de Vries EG, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H *et al.* In vivo VEGF imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med* 2007; **48**: 1313-9.
254. Perk LR, Visser GW, Vosjan MJ, Stigter-van Walsum M, Tijink BM, Leemans CR *et al.*  $^{89}\text{Zr}$  as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals  $^{90}\text{Y}$  and  $^{177}\text{Lu}$  in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med* 2005; **46**: 1898-906.
255. Chang AJ, de Silva RA, Lapi SE. Development and characterization of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled panitumumab for immuno-positron emission tomographic imaging of the epidermal growth factor receptor. *Mol Imaging* 2013; **12**: 17-27.
256. Yang X, Liu H, Sun CK, Natarajan A, Hu X, Wang X *et al.* Imaging of hepatocellular carcinoma patient-derived xenografts using  $^{89}\text{Zr}$ -labeled anti-glypican-3 monoclonal antibody. *Biomaterials* 2014; **35**: 6964-71.
257. Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC *et al.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention (EPR) effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* 2013; **73**: 2412-17.
258. Maeda H. Toward a full understanding of the EPR effect in primary and metastatic tumors as well as issues related to its heterogeneity. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; **91**: 3-6.
259. Meijs WE, Haisma HJ, Klok RP, vanGog FB, Kievit E, Pinedo HM *et al.* Zirconium-labeled monoclonal antibodies and their distribution in tumor-bearing nude mice. *J Nucl Med* 1997; **38**: 112-8.
260. Pool M, Kol A, Lub-de Hooge MN, Gerdes CA, de Jong S, de Vries EG *et al.* Extracellular domain shedding influences specific tumor uptake and organ distribution of the EGFR PET tracer  $^{89}\text{Zr}$ -imgatuzumab. *Oncotarget* 2016; **7**: 68111-121.
261. Frank RT, Aboody KS, Najbauer J. Strategies for enhancing antibody delivery to the brain. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1816**: 191-98.
262. Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, Mack AF, Wolburg-Buchholz K. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med* 2012; **33**: 579-89.

- 
263. Van Vulpen M, Kal HB, Taphoorn MJ, El-Sharouni SY. Changes in blood-brain barrier permeability induced by radiotherapy: Implications for timing of chemotherapy? *Oncol Rep* 2002; **9**: 683-88.
264. Paganelli G, Bartolomei M, Grana C, Ferrari M, Rocca P, Chinol M. Radioimmunotherapy of brain tumor. *Neurol Res* 2006; **28**: 518-22.
265. Singh M, Ferrara N. Modeling and predicting clinical efficacy for drugs targeting the tumor milieu. *Nat Biotechnol* 2012; **30**: 648-57.
266. Sausville EA, Burger AM. Contributions of human tumor xenografts to anticancer drug development. *Cancer Res* 2006; **66**: 3351-3354.
267. Oettle H, Post S, Neuhaus P, Gellert K, Langrehr J, Ridwelski K *et al.* Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; **297**: 267-77.
268. Cardin DB, Berlin JD. Pancreas cancer on the rise: are we up to the challenge? *J Natl Cancer Inst* 2013; **105**: 1675-6.
269. Koller M, Hartmans E, de Groot DJA, Zhao XJ, van Dam GM, Nagengast WB *et al.* Data-driven prioritization and review of targets for molecular-based theranostic approaches in pancreatic cancer. *J Nucl Med* 2017; **58**: 1899-1903.
270. Houghton JL, Abdel-Atti D, Scholz WW, Lewis JS. Preloading with unlabeled CA19.9 targeted human monoclonal antibody leads to improved PET imaging with <sup>89</sup>Zr-5B1. *Mol Pharm* 2017; **14**: 908-915.
271. Shultz LD, Goodwin N, Ishikawa F, Hosur V, Lyons BL, Greiner DL. Human cancer growth and therapy in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ null (NSG) mice. *Cold Spring Harb Protoc* 2014; **2014**: 694-708.
272. Puchalapalli M, Zeng X, Mu L, Anderson A, Glickman LH, Zhang M *et al.* NSG mice provide a better spontaneous model of breast cancer metastasis than athymic (nude) mice. *PLoS One* 2016; **11**: e0163521.
273. Ling B, Watt K, Banerjee S, Newsted D, Truesdell P, Adams J *et al.* A novel immunotherapy targeting MMP-14 limits hypoxia, immune suppression and metastasis in triple-negative breast cancer models. *Oncotarget* 2017; **8**: 58372-85.
274. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 683-93.
275. Zhao Y, Gutshall L, Jiang H, Baker A, Beil E, Obmolova G *et al.* Two routes for production and purification of Fab fragments in biopharmaceutical discovery research: Papain digestion of mAb and transient expression in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 2009; **67**: 182-9.

276. Rösch F, Baum RP. Generator-based PET radiopharmaceuticals for molecular imaging of tumours: on the way to THERANOSTICS. *Dalton Trans* 2011; **40**: 6104-11.
277. Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P *et al.* Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* 2014; **81**: 49-60.
278. Hultqvist G, Syvänen S, Fang XT, Lannfelt L, Sehlin D. Bivalent brain shuttle increases antibody uptake by monovalent binding to the transferrin receptor. *Theranostics* 2017; **7**: 308-18.
279. Heneweer C, Holland JP, Divilov V, Carlin S, Lewis JS. Magnitude of enhanced permeability and retention effect in tumors with different phenotypes: <sup>89</sup>Zr-albumin as a model system. *J Nucl Med* 2011; **52**: 625-33.
280. Price EW, Carnazza KE, Carlin SD, Cho A, Edwards KJ, Sevak KK *et al.* <sup>89</sup>Zr-DFO-AMG102 immuno-PET to determine local hepatocyte growth factor protein levels in tumors for enhanced patient selection. *J Nucl Med* 2017; **58**: 1386-94.
281. Aerts HJ, Dubois L, Perk L, Vermaelen P, van Dongen GA, Wouters BG *et al.* Disparity between in vivo EGFR expression and <sup>89</sup>Zr-labeled cetuximab uptake assessed with PET. *J Nucl Med* 2009; **50**: 123-31.
282. Menke-van der Houven van Oordt CW, Gootjes EC, Huisman MC, Vugts DJ, Roth C, Luik AM *et al.* <sup>89</sup>Zr-cetuximab PET imaging in patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 30384-93.
283. Laudański P, Swiatecka J, Kozłowski L, Leśniewska M, Wojtukiewicz M, Wołczyński S. Increased serum level of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP/MMP-14) in patients with breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; **48**: 101-3.
284. Christiansen J, Rajasekaran AK. Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 1493-501.
285. Zhang Y, Pastan I. High shed antigen levels within tumors: an additional barrier to immunoconjugate therapy. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 7981-6.



# ANEXOS

---

## Anexo 1. Publicaciones y congresos

Artículos derivados del trabajo de esta tesis:

- **García de Lucas Á**, Schuhmacher AJ, Oteo M, Romero Sanz E, Cámara JA, de Martino A *et al.* Targeting MT1-MMP as an ImmunoPET-Based Strategy for Imaging Gliomas. *PLoS ONE* 2016; **11**: e0158634 (Se adjunta copia del artículo completo en el anexo 2 y las figuras del material complementario en el anexo 3).

Presentaciones expuestas en congresos derivados del trabajo de esta tesis:

- **García de Lucas Á**, Oteo Vives M, González F, Romero Sanz E, Arroyo AG, F. Mulero, JL *et al.* MT1-MMP-targeted ImmunoPET for imaging pancreas cancer in a mouse model. En 1st ySMIN Meeting «Preclinical and Clinical Imaging Tools and Applications». Madrid; 2017.
- **García de Lucas Á**. Desarrollo de sondas moleculares para inmunoPET con aplicación en oncología. En Ciclo de seminarios de jóvenes investigadores, CIEMAT. Madrid; 2016.
- Morcillo MA, **García de Lucas Á**, Mulero F, López-Casas PP, Oteo Vives M, Romero Sanz E *et al.* PET with <sup>89</sup>Zr-anti-MT1-MMP in an orthotopic mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. En Congreso Anual de la Asociación Europea de Medicina Nuclear, EANM'15. Hamburgo; 2015.
- Martínez-Torrecuadrada J, **García de Lucas Á**, Schuhmacher AJ, Oteo Vives M, Cámara Serrano JA, Romero Sanz E *et al.* New <sup>89</sup>Zr-ImmunoPET probe for glioblastoma diagnosis based on targeting metalloproteases. En World Molecular Imaging Congress. Seul; 2014.
- **García de Lucas Á**, Romero Sanz E, Martínez Ortega A, Martínez Torrecuadrada JL, García Arroyo A, Oteo Vives M *et al.* Preparación de un anticuerpo monoclonal marcado con Zr-89 frente a la metaloproteasa MT1-MMP, biomarcador para el diagnóstico de diferentes tipos de cáncer mediante INMUNOPET. En 34.º Congreso de la SEMNIM. Madrid; 2014.

Otros artículos presentados durante el periodo de doctorado:

- Romero Sanz E, Martínez Ortega A, Oteo Vives M, **García de Lucas Á**, Morcillo MA. Preparation of <sup>68</sup>Ga-labelled DOTA-peptides using a manual labelling approach for small-animal PET imaging. *Appl Radiat Isot* 2016; **107**: 113-20.
- **García de Lucas Á**, Ahring PK, Larsen JS, Rivera-Arconada I, López-García JA, Mirza NR *et al.* GABAA  $\alpha$ 5 subunit-containing receptors do not contribute to reversal of inflammatory-induced spinal sensitization as indicated by the unique selectivity profile of the GABAA receptor allosteric modulator NS16085. *Biochem Pharmacol* 2015; **93**: 370-9.

Otras presentaciones en congresos expuestas durante el periodo de doctorado:

- Romero Sanz E, Martínez Ortega A, de Gregorio M, Oteo Vives M, **García de Lucas Á**, Peyres V *et al.* Purificación y concentración de  $^{44}\text{Sc}$ . Marcaje de potenciales radiofármacos PET". 34.º Congreso de la SEMNIM. Madrid; 2014.
- Romero Sanz E, Martínez Ortega A, Oteo Vives M, **García de Lucas Á**, Peyres V, García-Toraño E *et al.* Escandio-44, potencial radionucleido para PET. Diseño y evaluación de un generador piloto de  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ . En 34.º Congreso de la SEMNIM. Madrid; 2014.
- Romero Sanz E, Martínez Ortega A, Puertas G, Oteo Vives M, **García de Lucas Á**, Descalzo I *et al.* Potencial radiotrazador óseo marcado con escandio-44. 35.º Congreso de la SEMNIM. Burgos; 2015.
- Romero Sanz E, Martínez Ortega A, Oteo Vives M, **García de Lucas Á**, Peyres V, García-Toraño E *et al.* Escandio-44, potencial radionucleido para PET. Diseño y evaluación de un generador piloto de  $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ . 34.º Congreso de la SEMNIM. Madrid; 2014.

# Anexo 2 Artículo: Targeting MT1-MMP as an ImmunoPET-Based Strategy for Imaging Gliomas



## RESEARCH ARTICLE

## Targeting MT1-MMP as an ImmunoPET-Based Strategy for Imaging Gliomas

A. G. de Lucas<sup>1</sup>✉, A. J. Schuhmacher<sup>2</sup>✉, M. Oteo<sup>1</sup>, E. Romero<sup>1</sup>, J. A. Cámara<sup>6</sup>, A. de Martino<sup>3</sup>, A. G. Arroyo<sup>4</sup>, M. Á. Morcillo<sup>1</sup>, M. Squatrito<sup>2\*</sup>, J. L. Martínez-Torrecuadrada<sup>5\*</sup>, F. Mulero<sup>6\*</sup>

**1** Biomedical Application of Radioisotopes Unit, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain, **2** Seve Ballesteros Foundation Brain Tumour Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain, **3** Histopathology Unit, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain, **4** Matrix Metalloproteases Lab, Spanish National Center for Cardiovascular Research (CNIC), Madrid Spain, **5** Proteomics Unit, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain, **6** Molecular Imaging Unit, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [fmulero@cnio.es](mailto:fmulero@cnio.es) (FM); [jlmartinez@cnio.es](mailto:jlmartinez@cnio.es) (JLMT); [msquatrito@cnio.es](mailto:msquatrito@cnio.es) (MS)



CrossMark  
click for updates

### OPEN ACCESS

**Citation:** de Lucas AG, Schuhmacher AJ, Oteo M, Romero E, Cámara JA, de Martino A, et al. (2016) Targeting MT1-MMP as an ImmunoPET-Based Strategy for Imaging Gliomas. *PLoS ONE* 11(7): e0158634. doi:10.1371/journal.pone.0158634

**Editor:** Ilya Ulasov, Swedish Neuroscience Institute, UNITED STATES

**Received:** November 3, 2015

**Accepted:** June 20, 2016

**Published:** July 27, 2016

**Copyright:** © 2016 de Lucas et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** MAM JLMT AJS FMA: Crowdfunding platform "Precipita" FECYT (Spanish Foundation for Science and Technology) [<http://www.precipita.es/precipitado/deteccion-y-seguimiento-del-cancer-cerebral-mas-comun-y-danino.html>]. AGA JLMT: Regional Government of Madrid Angiobodies Programme S2010/BMD-2312 [[http://www.madrid.org/cs/Satellite?buscador=true&c=CM\\_ConvocaPrestac\\_FA&cid=1142619643182&language=es&pagename=ComunidadMadrid%2FEstructura](http://www.madrid.org/cs/Satellite?buscador=true&c=CM_ConvocaPrestac_FA&cid=1142619643182&language=es&pagename=ComunidadMadrid%2FEstructura)]. AJS: BBVA

## Abstract

### Background

A critical challenge in the management of Glioblastoma Multiforme (GBM) tumors is the accurate diagnosis and assessment of tumor progression in a noninvasive manner. We have identified Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) as an attractive biomarker for GBM imaging since this protein is actively involved in tumor growth and progression, correlates with tumor grade and is closely associated with poor prognosis in GBM patients. Here, we report the development of an immunoPET tracer for effective detection of MT1-MMP in GBM models.

### Methods

An anti-human MT1-MMP monoclonal antibody (mAb), LEM2/15, was conjugated to p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine (DFO-NCS) for <sup>89</sup>Zr labeling. Biodistribution and PET imaging studies were performed in xenograft mice bearing human GBM cells (U251) expressing MT1-MMP and non-expressing breast carcinoma cells (MCF-7) as negative control. Two orthotopic brain GBM models, patient-derived neurospheres (TS543) and U251 cells, with different degrees of blood-brain barrier (BBB) disruption were also used for PET imaging experiments.

### Results

<sup>89</sup>Zr labeling of DFO-LEM2/15 was achieved with high yield (>90%) and specific activity (78.5 MBq/mg). Biodistribution experiments indicated that <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM2/15 showed excellent potential as a radiotracer for detection of MT1-MMP positive GBM tumors. PET imaging also indicated a specific and prominent <sup>89</sup>Zr-DFO-LEM2/15 uptake in MT1-MMP+ U251 GBM

Foundation grant for Research, Innovation and Cultural Creation and M+Vision Advanced fellowship. MS: Marie Curie CIG grant & Seve Ballesteros Foundation grant.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

tumors compared to MT1-MMP- MCF-7 breast tumors. Results obtained in orthotopic brain GBM models revealed a high dependence of a disrupted BBB for tracer penetrance into tumors.  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 showed much higher accumulation in TS543 tumors with a highly disrupted BBB than in U251 orthotopic model in which the BBB permeability was only partially increased. Histological analysis confirmed the specificity of the immunoconjugate in all GBM models.

## Conclusion

A new anti MT1-MMP-mAb tracer,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15, was synthesized efficiently. In vivo validation showed high-specific-contrast imaging of MT1-MMP positive GBM tumors and provided strong evidence for utility of MT1-MMP-targeted immunoPET as an alternate to nonspecific imaging of GBM.

## Introduction

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common malignant tumor of the central nervous system (CNS) in adults. It belongs to a larger class of tumors known as glioma which arise from the astrocytic glial cells[1]. The World Health Organization has divided astrocytic-derived tumors into four grades based on their ability to infiltrate the surrounding brain tissue. Grade I glioma consists of benign pilocytic and other non-infiltrating tumors, while Grade II, III, and IV comprise infiltrating gliomas with increased malignancy[2]. GBM is a Grade IV glioma, corresponding with the most malignant form and has the worst prognosis. These tumors are also the most treatment-resistant and are difficult to image because of their diffuse infiltrative and proliferative features. Despite the recent advances in the understanding of their biology and in multimodality diagnostic and therapeutic procedures, these tumors maintain a high recurrence after treatment with very poor prognosis and increasing morbidity and mortality.

Clinical management is often compromised by an imprecise delineation of tumor boundaries, lack of assessment of the tumor sensitivity to a given therapy and late detection of recurrences. The currently employed imaging diagnostic tools, computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) provide excellent anatomical information on the localization of brain lesions, but are frequently not able to differentiate tumor tissue from other concurrent processes such as inflammation, edema or bleeding that give rise to under or over estimation of the actual extension of the tumor. In addition, the tumor response to treatment is conventionally measured by size change with MRI; however, this method does not consider the biological steps preceding the tumor reduction and prognostic evaluation cannot be obtained until weeks after the treatment initiation. These drawbacks make necessary to seek other non-invasive molecular imaging-based technologies that allow efficient and safe diagnosis providing additional and complementary biological information of the tumor. Positron Emission Tomography (PET) is widely used in oncology for staging, monitoring the efficacy of a given treatment and follow-up of a tumor recurrence because it offers an in vivo quantitative and comprehensive evaluation at the molecular level[3]. Conventional  $^{18}\text{F}$ -Fluorodeoxyglucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) imaging is of limited usefulness for imaging GBM due to high levels of glucose uptake by normal brain resulting in a low signal-background ratio. Additionally, increase in FDG uptake is not a cancer-specific process as it has also been observed in inflammatory lesions and may lead to false-positive results[4]. Consequently, several preclinical and clinical studies have investigated the use of

alternative PET radiotracers, such as labeled amino acids and their analogs  $^{11}\text{C}$ -Methionine ( $^{11}\text{C}$ -MET),  $^{18}\text{F}$ -fluoroethyl-tyrosine ( $^{18}\text{F}$ -FET) and  $^{18}\text{F}$ -fluoro-dihydroxyphenylalanine ( $^{18}\text{F}$ -FDOPA)[5–7]; nucleoside radiotracers such as  $^{18}\text{F}$ -Fluorothymidine ( $^{18}\text{F}$ -FLT)[8,9] with specificity for thymidine kinase-1 (TK-1) whose activity is elevated in the normal cellular S-phase and neoplastic tissues[10] or hypoxic tracers as  $^{18}\text{F}$ -Fluoromisonidazole ( $^{18}\text{F}$ -FMISO)[11]. Despite of showing a better detection of neoplastic tissue and treatment monitoring than glucose imaging, there is still a clinical need to analyze more specific molecular events and processes that could have a major impact on the understanding of glioma biology, for grading and prognosis and on selection and monitoring of therapies. A promising option to improve diagnostic imaging is the immunoPET, which combines the high sensitivity, and quantitative capabilities of PET with the specificity and selectivity of monoclonal antibodies (mAb) against a given tumor cell surface marker. This combination makes this technique comparable to conduct a noninvasive, in vivo quantifiable, three-dimensional full-body immunohistochemistry allowing the diagnosis and monitoring of patients over time in a non-invasive manner

Membrane type 1-Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP, also known as MMP14) has emerged as an attractive biomarker for tumor-targeted antibody development since this protein is crucial for the progression, invasion, migration and angiogenesis of tumors[12,13]; and specifically, its expression correlates with tumor grade and it is associated with reduced survival in gliomas[14,15] and other cancers[16]. In addition, a growing body of evidence reveals that overexpression of MT1-MMP plays also a significant role in promoting gliomagenesis[17]. MT1-MMP is broadly expressed in a variety of tissues and cell types including endothelial cells[18]. It belongs to a subset of zinc-dependent membrane-anchored MMPs able to degrade the basement membrane and proteins of the extracellular matrix (ECM)[19], cell adhesion molecules, cytokines, growth factors and receptors[20]. Many studies have highlighted its potential also as a therapeutic target in glioblastoma and other cancers[21,22]. In fact, a small molecule inhibitor, Marimastat, targeting MMP active site was tested in clinical trials with GBM patients[23,24]. However, this inhibitor failed because of unspecific inhibition of other MMPs with structurally conserved active sites leading to undesired side effects. Nonetheless, several highly-specific inhibiting antibodies such as DX-2400[25], 9E8[26] or LEM-2/15[27,28] have recently revived MT1-MMP as promising therapeutic target[29]. Besides, MT1-MMP would represent a candidate biomarker that can be leveraged for diagnostic purposes using specific probes, providing additional valuable information. Several studies using specific antibodies or peptides have demonstrated that molecules capable of tracing MT1-MMP might be used as imaging agents in several cancer models[30–32].

In the present study, we report the successful noninvasive detection of GBM tumors by PET imaging, using a radiolabeled MT1-MMP-specific mAb (LEM2/15) in mice xenografted with a glioma cell line expressing MT1-MMP or with patient-derived orthotopically implanted glioma tumor neurospheres. As a PET nuclide, we used  $^{89}\text{Zr}$  with a half-life ( $t_{1/2}$ ) of 78.4 h that is compatible to pharmacokinetics of intact antibodies (typically 2–4 days). The anti-MT1-MMP antibody was functionalized with an isothiocyanate-bearing derivate of desferrioxamine (DFO-NCS) as the  $^{89}\text{Zr}$  chelator. Our results support the feasibility of using noninvasive antibody-mediated PET imaging based on MT1-MMP marker to specifically visualize GBM tumors for diagnostic purposes.

## Materials and Methods

### Cell lines

GBM cell lines and neurospheres were kindly provided in 2012 by the Holland and Mellinghoff laboratories (MSKCC). SK-mel-103 cells were received from the Soengas laboratory (CNIO) in

2013. U251, T98G, U87-MG, SF-268, SF-295, MCF-7 and SK-mel103 cell lines were grown at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma) containing 10% FBS (Sigma). TS516, TS543, TS568, TS676 neurospheres are cultured in suspension in human NSC Basal Medium with NSC proliferation supplement, 1 mg/ml heparin (Stem Cell Technologies), 10 ng/ml recombinant human EGF (Invitrogen) and 20 ng/ml recombinant human basic FGF (Sigma). Primary tumor spheres were collected, mechanically disaggregated to a single-cell suspension and propagated by serial passaging.

### Protein isolation and immunoblotting

Whole protein lysates were isolated from cells lysed in NP-40 lysis buffer (0.5% NP-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaCl, 1x phosphatase inhibitor cocktail set II (Calbiochem) and protease inhibitor cocktail set III EDTA-free (Calbiochem), and protein quantified by BCA assay (Pierce). Protein lysates were (100  $\mu\text{g}$  per lane) separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Amersham) for immunoblotting. Membranes were probed with antibodies against MT1-MMP (LEM2/15) and detected using HRP-conjugated anti-mouse antibodies (Dako) using chemiluminescence detection (ECL, Amersham).

### Flow cytometry

Cell lines were detached from dishes using Cell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS (Life Technologies). After counting, single cell suspensions in FACS buffer (1% IgG Free BSA in PBS (Sigma)) were incubated with 1  $\mu\text{l}$  of Fc Block (BD) for every million cells for at least 15 min at 4°C. Cells were then stained with the LEM 2/15 purified antibodies at the indicated concentrations for 15 min at 4°C, washed twice with FACS buffer. Cells were then incubated with appropriate fluorophore-conjugated secondary antibody (Molecular Probes, Invitrogen) at a dilution 1:500 for 15 min at 4°C, washed with FACS buffer, and resuspended in FACS buffer containing DAPI (5mg/ml diluted 1:5,000) for live/dead cell exclusion. Antibodies used for flow cytometry include LEM 2/15 obtained from ascytes, purified from cell culture, DFO conjugated and  $^{89}\text{Zr}$  labeled and decayed. For analysis, samples were run on a BD LSR II (Becton Dickinson), and all subsequent compensation and gating performed with FlowJo analysis software (TreeStar).

### Radiolabeling of antibody

Hybridoma cells of LEM2/15 were cultured as described previously[27], and the mAb was purified from the hybridoma supernatant according to standard methods using Protein A-based chromatography. The bifunctional chelator DFO-NCS (Macrocyclics, Dallas, TX) was conjugated to LEM 2/15 and subsequent  $^{89}\text{Zr}$  radiolabeling was performed by adaptation of published protocols[33,34].  $^{89}\text{Zr}$  ( $T_{1/2} = 78.4$  h,  $\beta^+ = 22.6\%$ ;  $\sim 2.7$  GBq/ml supplied in 1 M oxalic acid) was obtained from BV Cyclotron VU (Amsterdam, The Netherlands).

For conjugation, 2 mg of LEM 2/15 in 1 ml solution at pH 9.0, adjusted with 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (max. 100  $\mu\text{l}$ ), were mixed with DFO-NCS (dissolved in DMSO at a concentration 3.5 mM) at a molar ratio of 1:5. The reaction was incubated for 40 min at 37°C. Non-conjugated chelator was removed by G25-Sephadex size-exclusion chromatography using a PD10 column (GE Healthcare Life Sciences) and 5 mg/ml gentisic acid in 0.25 M sodium acetate trihydrate (pH 5.4–5.6) as eluent.

For radiolabeling, the required volume of  $^{89}\text{Zr}$ -oxalic acid solution corresponding to 37–74 MBq was adjusted to a total volume of 200  $\mu\text{l}$  using 1 M oxalic acid, 90  $\mu\text{l}$  of 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were added and incubated for 3 min at room temperature. One ml of 0.5 M HEPES and 710  $\mu\text{l}$  of DFO-LEM 2/15 (1 mg/ml) were subsequently added and incubated at room temperature for

90 min on a rotating shaker. pH was checked to be at 7.0–7.5. Finally, the reaction mixture was loaded onto a previously equilibrated PD-10 column and eluted with phosphate-buffered saline (PBS) into fractions of 500  $\mu\text{L}$ . After purification, the collected fractions were measured in a dose calibrator (IBC, Veenstra Instruments). Quality control was performed by instant thin-layer chromatography (ITLC) on ITLC strips (model 150–771, Biodex) using 0.02 M citrate buffer (pH 5.0):acetonitrile (9:1) as eluent.

The stability of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 was investigated by incubation in human serum for 7 days at 4°C and 37°C. The radiochemical purity was determined by ITLC as discussed above.

The DFO-NCS to LEM 2/15 molar ratio was determined before removing unconjugated chelate. Thus, a small aliquot of the reaction mixture was reacted with a tracer amount of  $^{89}\text{Zr}$ -oxalic acid for 90 min at room temperature. The mixture was put on a PD-10 column and eluted with PBS. The percentage of radioactivity present at the antibody fraction was then determined. The number of chelating molecules incorporated per antibody was calculated from the labeling efficiency and the molar ratio of added chelating agent to antibody.

The same procedure described for  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 was followed to produce the  $^{89}\text{Zr}$ -labeled non-specific mouse IgG1 (BioXCell, USA) used as isotype control antibody ( $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1).

### Subcutaneous and orthotopic tumor mouse models

For subcutaneous heterotopic xenografts 750,000 U251 or 1,000,000 MCF-7 cells were resuspended in 200  $\mu\text{l}$  of a 1:1 mix of DMEM (Sigma) with Matrigel (BD Biosciences). Next, the Matrigel:DMEM-cells mixture was injected subcutaneously into the flanks of 6 weeks athymic nude mice (Nude-Foxn1nu, Harlan Laboratories). Tumors were allowed to develop until palpable prior immunoPET analysis and were measured 3 times per week by caliper. Mice were sacrificed when the tumor mass reached a maximum size of 1500  $\text{mm}^3$  or tumor ulceration was observed or mice were symptomatic from their tumors which included signs of lethargy, poor grooming, weight loss and hunching.

For orthotopic xenografts, U251 cells and primary TS543 neurospheres were transduced with a TK-GFP-Luciferase reporter plasmid (TGL) to monitor tumor growth by bioluminescence measurements and were described previously[35]. TS543 cells were previously used in intracranial PET imaging studies[36]. To develop intracranial tumors athymic nude mice (Harlan) were fully anesthetized with 10mg/ml ketamine and 1mg/ml xylazine and were subcutaneously injected with 50  $\mu\text{l}$  of the local anesthetic 0.25% bupivacaine at the surgical site. Mice were intracranially injected with 1.5  $\mu\text{l}$  containing  $2.5 \times 10^5$  U251-TGL cells or  $5 \times 10^4$  TS543-TGL (resuspended in PBS) at 6 weeks of age using a fixed stereotactic apparatus (Stoelting). Injections were made to the right frontal cortex, approximately 1 mm caudal and 1.5 mm lateral from bregma, and at a depth of 2 mm using a Hamilton syringe (Hamilton) as described previously[37]. Tumor growth was monitored by luminescence. Mice were injected with D-Luciferin (150 mg/kg). 15 minutes after injection, images were acquired for 5 seconds using an IVIS200 machine (Perkin Elmer). Bioluminescence analysis was performed using Living Image software, version 2.50. When tumors were in a positive growth phase determined by bioluminescence imaging (BLI) output, immunoPETs were performed. Mice were monitored by BLI every 3 days and sacrificed at the time points described or when they became symptomatic from their tumors, which included signs of lethargy, poor grooming, weight loss, hunching, macrocephaly or seizures. All animal experiments were performed according to protocols approved by the CNIO-ISCIII Ethics Committee for Research and Animal Welfare (CEIyBA) and they were performed in accordance with the guidelines stated in the International Guiding

Principles for Biomedical Research Involving Animals, developed by the Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS).

### Pharmacokinetic and biodistribution studies

Four groups of 4 female athymic mice each bearing U251 cells in flanks were injected i.v. (tail vein) with 1.5 MBq (20  $\mu\text{g}$ ) of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Mice were euthanized at 1, 2, 4 and 7 days after injection by cervical dislocation under anesthesia with isoflurane in  $\text{O}_2$  and blood was immediately collected by cardiac puncture. For biodistribution studies organ tissues and tumors were excised, wet-weighed and counted for radioactivity with a gamma-counter (2470 Wizard<sup>2</sup>, PerkinElmer), along with a standard sample of the injected dose. Tissue activity was expressed as percentage injected dose per gram of tissue (%ID/g). Subsequently, tumors were formalin-fixed and stored at 4°C for immunohistochemical assays. For pharmacokinetic studies, blood samples were collected in heparinized tubes and centrifuged at 3000 rpm for 10 min to obtain plasma. Plasma concentrations of radioactivity were calculated as the percent injected dose per mL (%ID/mL) and were plotted versus the time post-injection. Pharmacokinetic parameters were estimated by noncompartmental analysis[38] using the computer program WinNonlin Professional, version 5.2 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA).

### microPET/CT imaging

Eleven mice bearing breast cancer cells (non-expressing MT1-MMP) in one flank and GBM cells (expressing MT1-MMP) in the contralateral side were injected i.v. (tail vein) with 1.5 MBq (20  $\mu\text{g}$ ) of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 and scanned with a small-animal Argus PET-CT scanner (SEDECAL, Madrid, Spain). The PET studies (energy window 250–700 KeV and 30 min static acquisition) and CT (voltage 45 kV, current 150  $\mu\text{A}$ , 8 shots, 360 projections and standard resolution) were performed at various time points post-injection (1, 2, 4 and 7 days) in mice anesthetized by inhalation of 2–2.5% Isoflurane. The PET images were reconstructed using a 2D-OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization) algorithm (16 subsets and two iterations), with random and scatter correction. Manually drawn regions of interest (ROIs) were used to determine the mean radiotracer accumulation in units of %ID/g tissue (decay corrected to the time of injection) in both tumors, brain (used as background tissue), and heart (used as blood pool). Images were analyzed using the image analysis software ITK-SNAP ([www.itksnap.org](http://www.itksnap.org)). With the aim to obtain a more accurate quantification of the radiotracer in tumors, PET images were corrected for partial volume effect using tumor volume segmented from coregistered CT images. Recovery coefficients (RC, ratio between measured and true activity and used to correct the partial volume effect), were calculated using the phantom described in the NEMA NU 4–2008 protocol[39].

For the orthotopic models (n = 3–5) PET/CT scans were performed as described above.

### Immunohistochemistry

MT1-MMP expression was analysed on a human glioma tissue microarray (TMA) from the CNIO Biobank, comprised by a total of 40 different formalin-fixed paraffin-embedded samples in duplicate, 20 of high grade glioma (HGG, WHO grade IV, GBM) and 20 of low grade glioma (LGG, 15 of WHO grade II and 5 of WHO grade I). Immunohistochemical staining was performed using anti-MT1-MMP LEM 2/15 antibody at 1:400 dilution after antigen retrieval with low pH buffer in Autostainer platform (Dako) and counterstained with hematoxylin. Slides were digitalized using the Mirax Scan (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) and pictures were taken with the Panoramic Viewer software (3D Histech Ltd., Ramsey, NJ, USA).



On the other hand, tumor-bearing mice were sacrificed after the last 48 h PET imaging and tumors or brains were excised, fixed in 10% buffered formalin (Sigma) and embedded in paraffin. For histopathological analysis, tissues were serially sectioned (3  $\mu$ m) and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For analysis of MT1-MMP expression, immunohistochemical staining was performed as described above.

For double staining immunohistochemistry, slides were incubated sequentially with the appropriate first and second primary antibodies as detailed: anti-MT1-MMP LEM 2/15 antibody (1/400) followed by rabbit polyclonal anti-CD31 (1:50, Abcam ab28364) or anti-MT1-MMP LEM 2/15 antibody (1/400) followed by pre-diluted rabbit monoclonal anti-Ki67 (clone MIB1, Dako). After the primary antibody, slides were incubated with the corresponding visualization systems as needed (OmniRabbit, Ventana; Roche or Goat anti Rabbit; Dako) conjugated with horseradish peroxidase and UltraMap anti-Rb Alk Phos (Ventana; Roche) conjugated with alkaline phosphatase. Immunohistochemical reaction was developed using using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as chromogen (Chromomaps DAB; Ventana, Roche) or naphthol-AS-phosphate and fast red (Chromomaps Red; Ventana, Roche). Finally, nuclei were counterstained with Carazzi's hematoxylin. Digital slides were acquired as described above.

### Evaluation of the BBB disruption by Evans Blue staining

The alteration of the BBB was determined by following procedures previously described by Manaenko et al. [40]. 6–8 weeks old athymic/nude mice were intracranially injected with U251-TGL and TS543-TGL cells using a fixed stereotactic apparatus (Stoelting) and monitored for brain tumor development as described above for PET imaging. Littermates were mock injected with 1.5  $\mu$ l of PBS as controls and sacrificed at the same time. Non injected athymic/nude littermates were included as intact brain controls.

To evaluate the BBB status, mice were injected IP with 800  $\mu$ l of 2% Evan's blue dye (Sigma). One hour after injection, mice were anesthetized and perfused with acidified fixative (1% PFA in 0.05 mM citrate buffer, pH 3.5). Thirty mg of brain tissue were incubated in 500  $\mu$ l formamide (Sigma) to extract Evan's blue at 60°C overnight. Absorbance was measured at 610 nm and 740 nm on a plate reader (Sinergy 4, BioTek Instruments, USA).

### Ex vivo Autoradiography

After PET/CT scans at 48 hours after injection, mice were euthanized, and tumors or whole brains bearing orthotopic tumors were removed and frozen in the OCT compound (Tissue-Tek, USA). The frozen tissues were sectioned into 30- $\mu$ m thick slices by a cryostat (CM 1850, Leica). Autoradiography (ARG) was acquired by exposing the frozen sections to a phosphor screen, using a STORM 820 Phosphor Imager (GE Healthcare). For staining techniques after autoradiography, frozen samples were serially cut at 10  $\mu$ m and mounted on glass slides, thawed and allowed to dry for 30 minutes. Slides were then fixed in 10% neutral buffered formalin for 10 minutes. Consecutive sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and for immunohistochemistry analysis with LEM2/15, as described above.

### REMBRANDT Dataset

Glioma expression data of the REMBRANDT dataset [41] were analyzed through the Gliovis portal (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es>). Data can be accessed at the Gliovis portal or at The Georgetown Database of Cancer Plus (<https://gdoc.georgetown.edu/gdoc/>).

## Statistical Analysis

Tukey's honest significant differences (HSD) in conjunction with ANOVA were performed for multiple comparison analysis using the R statistical software. Data in bar graphs are presented as the mean $\pm$ SD. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test for nonparametric data and the unpaired t test for parametric data. The Grubbs test was applied to detect eventual outliers in data sets with the online "Outlier Calculator" tool (<http://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). A *P* value of 0.05 or less was considered significant.

## Results

### Validation of MT1-MMP as suitable biomarker of GBM

To determine whether MT1-MMP could be considered as an appropriate biomarker for gliomas, we studied its expression in a panel of 40 human glioma samples (WHO grade I, II and IV) by tissue microarray immunohistochemical analysis, using the anti-MT1-MMP LEM 2/15 antibody. A higher level of expression of MT1-MMP in GBM (HGG) was found as compared to low-grade gliomas (LGG) (Fig 1A) and it could be detected mainly in tumors but also in some endothelial cells. Moreover, analysis of a panel of different glioma cell lines and tumor neurospheres (TS) by immunoblot (Fig 1B) and FACS (Fig 1C) showed high MT1-MMP expression. Importantly, the ability of LEM-2/15 mAb to recognize intact MT1-MMP by FACS highlights its potential use for in vivo applications like immunoPET. Further validation with glioma patient public datasets was performed confirming that an increase of MT1-MMP expression at the mRNA level in GBM is observed compared to LGGs as oligodendroglioma and astrocytoma (grade II and III) (S1A and S1B Fig) and that high levels of MT1-MMP are associated with worse prognosis and a decreased survival in GBM patients (S1C Fig).

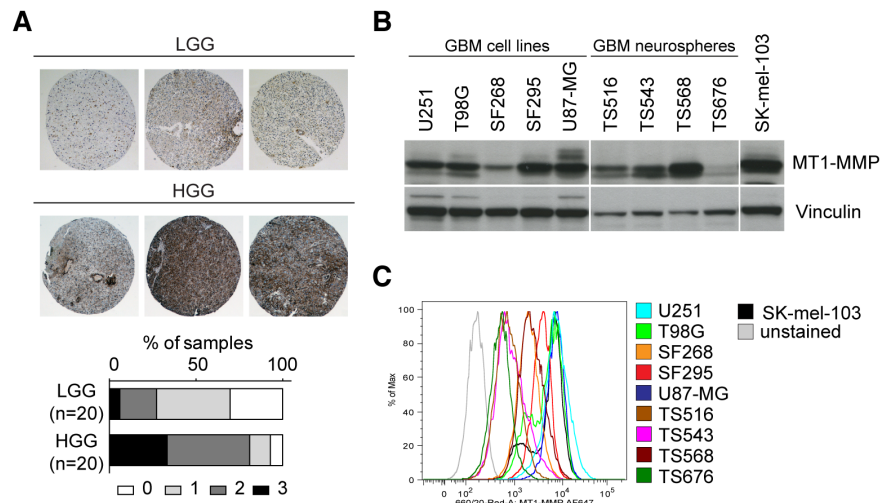
### Characterization and stability of $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15

Selected conjugation conditions comprised the addition of a five-fold molar excess of DFO-NCS to the LEM2/15 solution, a reaction pH of 9.0, and incubation for 40 min at 37°C. These conditions resulted in a chelate:mAb substitution ratio of about 2–3:1. The radiochemical yield, purity, and specific activity of the  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 used in this study were >90%, >98% and  $78.5 \pm 7.2$  MBq/mg (*n* = 4) respectively, assuming virtually complete recovery of the DFO-mAb conjugates after size exclusion chromatography. Incubation of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 in human serum for 7 days, at 4°C or 37°C, revealed a stability of  $99.2 \pm 0.5\%$  (*n* = 3) and  $99.1 \pm 0.3\%$  (*n* = 3), respectively.

### Biodistribution and pharmacokinetics of $^{89}\text{Zr}$ -LEM 2/15

Biodistribution experiments using  $^{89}\text{Zr}$ -LEM 2/15 (Fig 2) were conducted in nude mice bearing MT1-MMP expressing U251 and revealed a normal antibody organ distribution. In GBM tumors, the higher uptake is observed 24h post-injection ( $22.63 \pm 3.67\%$ ID/g) and then it decreased in a time-dependent manner. Data showed high liver retention ( $27.47 \pm 3.3\%$ ID/g) compared to the spleen, kidneys and lungs, spanning a range between 5–15%ID/g which is representative of the hepatic clearance of full-length IgGs. The activity of the rest of organs and tissues was low (often below 5%ID/g) and decreased gradually with time except for bone which shown an increasing uptake along time.

Pharmacokinetic studies determined that the terminal phase half-life and the mean residence times were 3.2 and 4.5 days, respectively, and the volume of distribution at steady state was 2.15 mL (84 mL/kg). The systemic clearance was 0.47 mL/d (18.4 mL/d/kg), value in agreement with those obtained for therapeutic monoclonal antibodies in mice[42].

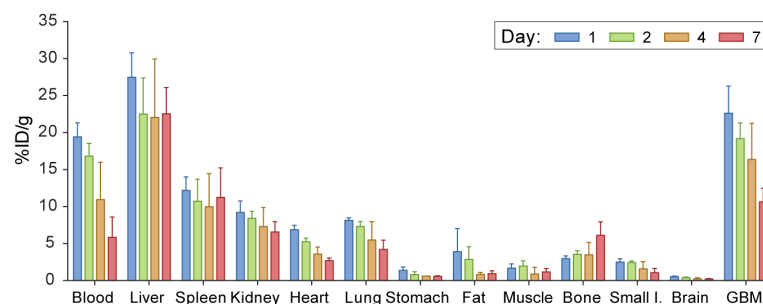


**Fig 1. MT1-MMP protein expression analysis.** **A)** Immunohistochemistry with the LEM2/15 anti MT1-MMP antibody in a TMA (n = 40) of Low-grade GBMs (LGG) and High-grade GBMs (HGG) patient tissues (representative images). Right panel: MT1-MMP staining intensity score (0–3). **B)** Immunoblotting and **C)** FACS analyses of the indicated cell lines using the LEM2/15 anti MT1-MMP antibody.

doi:10.1371/journal.pone.0158634.g001

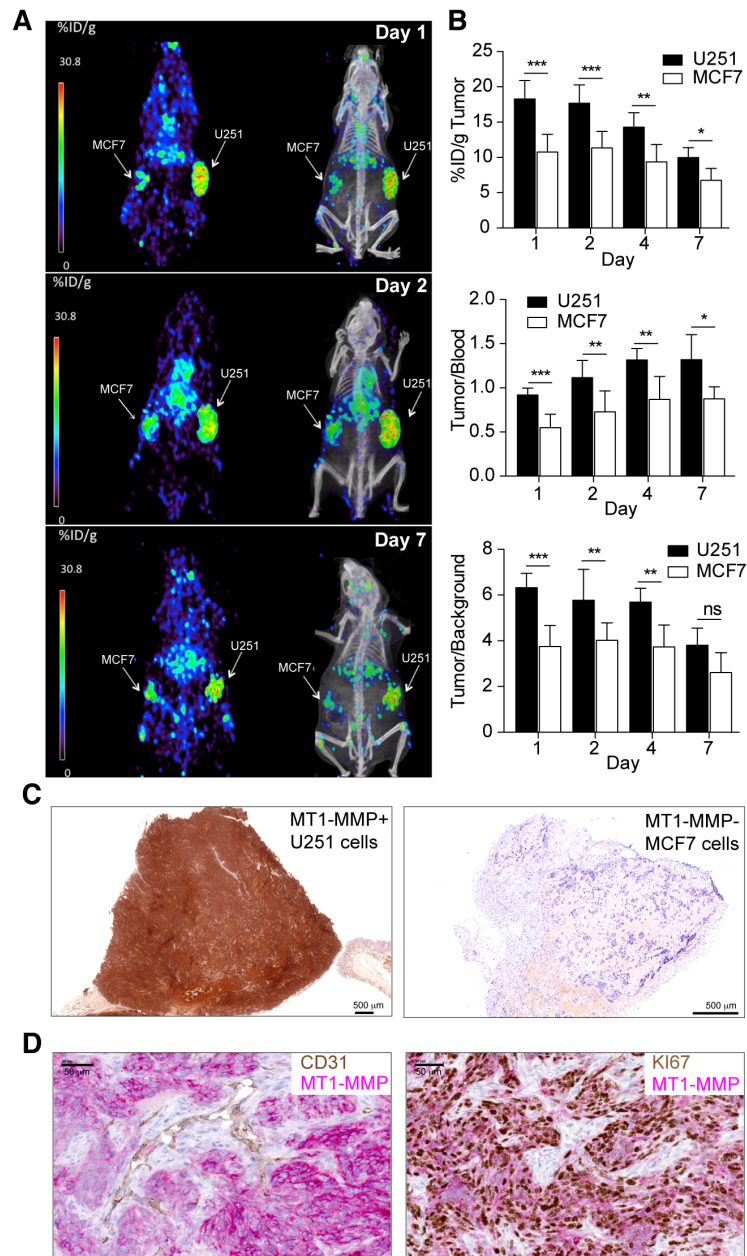
### $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 PET imaging of subcutaneous glioma xenografts

$^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 small-animal PET was conducted on mice harboring xenograft tumors at opposite flanks with MT1-MMP<sup>+</sup> GBM U251 cells and MT1-MMP<sup>-</sup> breast MCF7 cells. Assessment of MT1-MMP expression in U251 and MCF7 by FACS and immunoblotting confirmed high and null expression of U251 and MCF7, respectively (data not shown). Levels of radioactivity in tumors, tumor-to-blood and tumor-to-background ratios were calculated. In tumors, radioactivity decreased in a time-dependent manner, with the uptake being  $18.3 \pm 2.6$  (n = 11),  $17.7 \pm 2.6$  (n = 8),  $14.3 \pm 2.0$  (n = 6) and  $10 \pm 1.4$  (n = 4) %ID/g at 1, 2, 4 and 7 days p.i., respectively in MT1-MMP<sup>+</sup> U251 tumors, and  $10.8 \pm 2.5$  (n = 11),  $11.4 \pm 2.3$  (n = 8),  $9.4 \pm 2.4$  (n = 6) and  $6.8 \pm 1.7$  (n = 4) %ID/g at 1, 2, 4 and 7 days p.i., respectively in MT1-MMP<sup>-</sup> MCF-7 tumors (Fig 3A and 3B top panel and S1 Video). The uptake in MT1-MMP<sup>+</sup> tumors was significantly higher than in MT1-MMP<sup>-</sup> tumors at all times. Tumor/blood ratios in GBM/MT1-MMP<sup>+</sup> tumors were  $0.88 \pm 0.08$ ,  $1.07 \pm 0.19$ ,  $1.29 \pm 0.12$  and  $1.31 \pm 0.29$  at 1, 2, 4 and 7 days post-injection,



**Fig 2. Biodistribution of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 in mice bearing MT1-MMP<sup>+</sup> GBM cells (U251).**

doi:10.1371/journal.pone.0158634.g002



**Fig 3. PET/CT imaging with radiolabeled  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 in mice bearing MT1-MMP+ GBM cells (U251) and MT1-MMP- breast cancer cells (MCF-7).** **A)** Representative coronal whole-body PET and CT sections at 1, 2 and 7 days p.i.; **B)** Levels of radioactivity in tumors, tumor to blood and tumor to background ratios derived from PET imaging after  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 administration to mice bearing MT1-MMP+ and MT1-MMP- tumors (mean $\pm$ SD, n = 11–4/time); **C)** Immunohistochemistry of tumor tissue from xenografted mice used for PET imaging. MT1-MMP was detected using LEM2/15 antibody. Scale bars: 500  $\mu\text{m}$  **D)** Representative images of double immunostaining for MT1-MMP (pink) and CD31 vascular marker (brown) (left panel) and for MT1-MMP (pink) and Ki67 proliferation marker (brown) (right panel) in U251 tumor implants from xenografted mice used for PET imaging. Scale bars: 50  $\mu\text{m}$ . Significant differences: p<0.05 (\*), p<0.001 (\*\*), p<0.0001 (\*\*\*), ns, not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0158634.g003

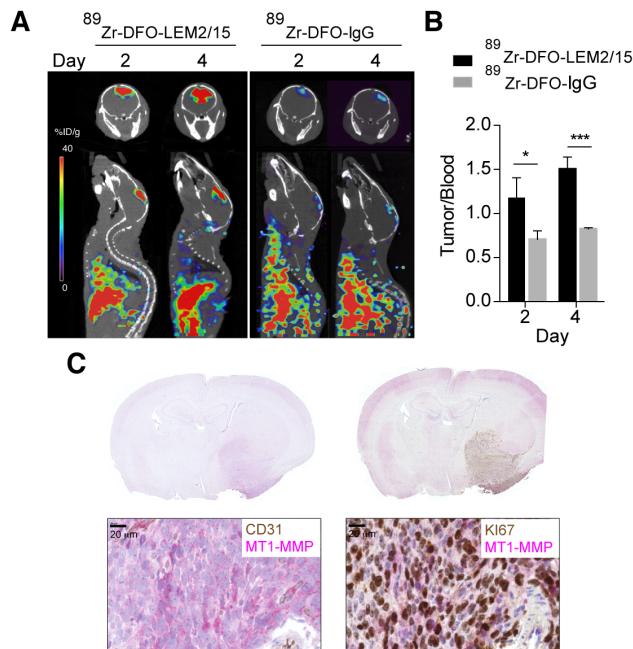
respectively (Fig 3B middle panel). However, tumor/blood ratios in breast MT1-MMP<sup>-</sup> cells were significantly lower ( $0.51\pm 0.15$ ,  $0.67\pm 0.23$ ,  $0.81\pm 0.24$  and  $0.80\pm 0.11$  at 1, 2, 4 and 7 days post-injection, respectively) than those for GBM/MT1-MMP<sup>+</sup> tumors. Tumor/background ratios in GBM/MT1-MMP<sup>+</sup> tumors exhibited high values after 1 day ( $6.32\pm 0.62$ ,  $5.77\pm 0.77$ ,  $5.68\pm 0.61$  and  $3.80\pm 0.74$  at 1, 2, 4 and 7 days p.i., respectively) in contrast to significantly lower values obtained with breast MT1-MMP<sup>-</sup> tumors ( $3.74\pm 0.92$ ,  $4.02\pm 0.75$ ,  $3.73\pm 0.95$  and  $2.60\pm 0.86$  at 1, 2, 4 and 7 days p.i., respectively) (Fig 3B bottom panel). In addition, immunohistochemical staining of tumors excised 48h after PET scan by using the LEM2/15 antibody confirmed high expression of MT1-MMP in the U251 xenograft (Fig 3C, left panel) and its absence in the MCF7 tumor (Fig 3C, right panel). To obtain more detailed information with regard to the localization of MT1-MMP expression within the tumor, double staining immunohistochemistry analyses with LEM2/15 antibody and tumor (Ki67) or vascular (CD31) markers were performed (Fig 3D). We determined that tumor cells (Ki67+) immunostained strongly positive for MT1-MMP while most endothelial cells (CD31+) did not stain at all. This would suggest that LEM2/15 does not recognize properly mouse MT1-MMP, therefore we could exclude that the PET signal come from the endothelial cells. Digital autoradiography and histologic staining revealed a homogeneous distribution of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 in the U251 tumors corresponding to the MT1-MMP-expressing regions (S2A Fig).

### $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 PET imaging of intracranial xenograft tumors

To determine the applicability of PET imaging to GBM tumor in a more clinically relevant mouse orthotopic model, PET/CT imaging with  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 and a control  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1 was performed 10 days after intracranial injections of patient-derived neurospheres (TS543). Presence of tumors was confirmed by bioluminescence. The brain PET image (Fig 4A and S2 Video) shows that  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 was specifically accumulated in tumor, enabling its accurate localization and delineation. Posterior quantitative analysis of tumor/blood ratios of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 compared with control  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1 distribution ( $1.17\pm 0.23$  and  $1.50\pm 0.14$  versus  $0.71\pm 0.10$  and  $0.82\pm 0.01$  at 2 and 4 days p.i., respectively) revealed significant differences over time (Fig 4B and S3A Fig), indicating an MT1-MMP-mediated specific tumor uptake in this model. Sections of mouse brains bearing the GBM xenografts immunostained for MT1-MMP confirmed the expression of this protein in the tumor tissue but not in the surrounding brain tissue or in vascular endothelial cells, where most of the tumor vessels were negative for LEM2/15 staining (Fig 4C).

Interestingly, the  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 antibody only caused a very weak signal in an orthotopic U251 tumor model and did not show a significant difference between tumor/blood ratios of the specific labeled antibody and control  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1 ( $0.23\pm 0.04$  and  $0.30\pm 0.03$  versus  $0.17\pm 0.05$  and  $0.21\pm 0.10$ , at 2 and 4 days p.i., respectively) (S3A Fig), despite the considerably higher expression of MT1-MMP on U251 cells as compared with TS543 neurospheres (Fig 1C). To test whether the differences in the  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 uptake, between the U251 and TS543 orthotopic models, were associated to the integrity of the blood-brain barrier (BBB) we performed an Evans blue (EB) staining. U251 tumors showed significantly lower EB staining than TS543 tumors ( $9.14\pm 3.14$  versus  $39.35\pm 26.83$   $\mu\text{g}$  of EB/g tissue, respectively; intact or mock surgery brain:  $2.12\pm 0.77$  or  $2.03\pm 0.51$   $\mu\text{g}$  of EB/g tissue, respectively) (S3B Fig), indicating only partially increased BBB-permeability in the U251 model and a highly disrupted BBB in the TS543 model.

In conclusion, small animal PET/CT using  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 mAb enabled the specific and efficient detection of aggressive TS543 neurosphere-derived tumors in which the BBB is disrupted.



**Fig 4. PET/CT imaging with radiolabeled  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 in mice bearing orthotopic xenografts containing patient-derived neurospheres.** **A**) Representative fused PET/CT images of coronal and sagittal planes at 2 and 4 days p.i. containing TS43 brain tumors with  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 (left panels) and  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1 as isotype control (right panels) **B**) Tumor-to-blood ratios for  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 (black bars) and  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1 (grey bars) in nude mice bearing orthotopic TS453 xenografts at 2 and 4 days p.i. derived from PET imaging. Values are presented as mean $\pm$ SD (n = 3–5). **C**) Representative brain images of double immunostaining for MT1-MMP (pink) and CD31 vascular marker (brown) (left panel) and for MT1-MMP (pink) and Ki67 proliferation marker (brown) from orthotopic TS453 xenografts used for PET imaging. Higher-magnification are shown in the bottom panels. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ . Significant differences: p<0.05 (\*) and p<0.0001 (\*\*\*).

doi:10.1371/journal.pone.0158634.g004

## Discussion

GBM remains one of the most deadly form of human cancer despite tremendous advances in surgical approaches, radiotherapy and chemotherapy over the last decades, with an average survival of 14–16 months using the current standard of care based on administration of radiotherapy and concomitant and adjuvant temozolomide [43][44]. Therefore, significant improvements in understanding of molecular pathogenesis, as well as in diagnosis and novel therapeutic strategies should be made to increase patient survival rates [45]. In particular, accurate diagnosis has a key role in clinical management of GBM patients. Treatment follow-up and clinical decision-making are currently based on the accuracy of non-invasive imaging techniques such as MRI or PET targeting aberrant metabolic processes. MRI has limitations in identifying tumor grade, invasive growth into neighboring tissue, treatment-induced changes and recurrences because pseudoprogression and tumor progression cannot be properly distinguished [46]. PET imaging with  $^{18}\text{F}$ -FDG and especially other PET tracers such as  $^{11}\text{C}$ -MET,  $^{11}\text{C}$ -TYR,  $^{18}\text{F}$ -FET or  $^{18}\text{F}$ -DOPA have shown a great potential for cerebral GBM diagnosis, however their sensitivity and specificity for detecting tumor growth or shrinkage remains to be fully validated [47]. These drawbacks make necessary to seek urgently other noninvasive biologic-based imaging with molecularly targeted agents such as immunoPET

[48] that might improve the specificity of tumor diagnosis compared with the more anatomical based techniques.

Herein, we provide proof of concept that MT1-MMP expression can be quantitatively assessed by an immunoPET using a specific monoclonal antibody (LEM 2/15), readily labeled with  $^{89}\text{Zr}$  and used for *in vivo* tumor imaging. Furthermore, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* properties of this labeled antibody to develop a new PET probe for glioma detection, showing that  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15-mediated PET yields high resolution detailed images with high tumor-to-background contrast in flank and orthotopic xenograft models of GBM. Therefore, this study was performed to establish and validate MT1-MMP as a candidate for GBM diagnosis by means of noninvasive PET imaging.

We chose the function-blocking antibody LEM2/15 because it shows very high specificity for MT1-MMP. It was generated against the V-B loop of MT1-MMP (residues 218–233) [27] which is located outside the conserved catalytic cleft and therefore its epitope displays low sequence homology among the MMP family. Recently, the crystal structure of Fab LEM2/15 complexed with the catalytic domain of MT1-MMP has shed light on the molecular mechanism of the allosteric inhibition of this enzyme by the antibody [28]. This work pointed to the potential utility of LEM2/15 as lead for the development of novel MMP-targeted therapeutics [29]. In this context, our goal would also be the integration of LEM2/15-based PET into the process of the drug development in preclinical studies and eventually for clinical translation to monitor noninvasively target expression.

First, we tested whether MT1-MMP was indeed a suitable target for a PET biomarker of GBM by studying extensively MT1-MMP expression at different levels. Utilizing bioinformatics analysis of the REMBRANDT dataset, we confirmed a significant correlation between increased MT1-MMP expression with advanced tumor grades, malignancy and shorter overall survival for GBM patients, in concordance with previously reported results [15,17,49]. Further validation was carried out at protein level, detecting MT1-MMP in a panel of glioma cells by immunoblotting and FACS; and in a TMA immunohistochemistry staining with glioma samples of various grades, in which we documented a marked increase in expression of MT1-MMP in GBM compared to low-grade gliomas. Altogether, our data suggested the feasibility of MT1-MMP to become a suitable molecular target for GBM diagnosis. MT1-MMP overexpression would indicate tumor progression towards more aggressive phenotypes associated with a worse prognosis, and also predict that the LEM2/15 antibody would have potential utility as MT1-MMP-targeted PET probe for imaging of GBM.

Previous studies have explored the use of MT1-MMP as imaging biomarker in SPECT [31,32,50], optical imaging [30] and PET/optical imaging using cleavable PEGylated MT1-MMP substrate peptide probes conjugated with  $^{18}\text{F}$ -labeled BODIPY (boron dipyrromethene) scaffold which allows an effective integration of fluorescence-based imaging with PET studies to monitor MT1-MMP proteolytic activity [51]. However, to the best of our knowledge, this is the first time that a MT1-MMP-based immunoPET is described for GBM detection and it is expected to have greater performance than other MT1-MMP-based imaging systems developed up to now: immunoPET combines the antibody characteristics of high specificity, affinity and great structural flexibility to generate a variety of fragments with half-lives matching optimally the period of semi-desintegration of isotopes, with PET as imaging technique which provides higher spatial resolution and sensitivity than SPECT from a clinical perspective.

Concerning radiolabeling, experiments on different Zr coordination methods have reported that  $^{89}\text{Zr}$ -DFO mAbs provides higher *in vivo* stability with respect to demetalation and relatively low levels of radiotracer accumulation in background tissue, especially in bones [52] and hence DFO is currently the best chelator for  $^{89}\text{Zr}$  [53]. The results reported here are consistent with previous investigations and confirmed that  $^{89}\text{Zr}$  is a suitable radionuclide for labeling

intact antibodies[33,54,55]. Biodistribution studies with the U251 murine model revealed specific MT1-MMP driven uptake of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO LEM2/15 in GBM tumors (about 30%ID/g at 24h), declining in a time-dependent manner up to 15% ID/g at 7 days p.i. Most likely this increased clearance of radioactivity at tumor site represents metabolism instead of loss of  $^{89}\text{Zr}$ , due to lack of complex stability since  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 was very stable in serum, with no significant dissociation of the complexes after 7 days. In non-target tissues, organs of the reticuloendothelial system showed relatively high uptake, especially liver, which is attributable to the biological elimination of the tracer, given that antibodies are usually cleared through their interaction with the Fc receptors expressed on cells of this system[56], and is a pattern frequently observed with radiolabeled antibodies[57–59]. Also, an increasing accumulation of activity in the bones is observed along time, just the same as in previous studies using DFO as a chelator [60], since Zr ion shows a high affinity for bones[52].

Regardless of the antibody/antigen system, no *in vivo* investigation of an  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-labeled imaging probe is complete without a demonstration of selectivity. This can be achieved using a cell line that does not express the antigen in question (i.e., MT1-MMP), such as MCF-7 cell line used in the present study. To confirm that the accumulation of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 was attributable to specific rather than non-specific bindings, we implanted MT1-MMP-expressing and non-expressing tumor cells within the same animal in the microPET/CT experiments. Tumor/blood ratios of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO LEM2/15 in GBM MT1-MMP<sup>+</sup> tumors were significantly higher than those in breast MT1-MMP<sup>-</sup> tumors, indicating the specificity of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 toward MT1-MMP. The unspecific accumulation of the antibody in breast tumors could be due to the enhanced permeability and retention (EPR) effect, which is characterized by a leaky nature of tumor vasculature and reduced lymphatic drainage [61], rather than an involvement of the vasculature since LEM2/15 showed no reactivity with most of the mouse tumor blood vessels by IHC. In fact, it has been previously described that LEM2/15 antibody reacted poorly with MT1-MMP from murine origin [62].

Compared to some limitations of the subcutaneous model, orthotopic tumor models more closely mimic the natural biologic behavior and characteristics of human tumors because they grow in its native microenvironment and reliably replicate certain important characteristics. For the generation of orthotopic GBM xenografts we employed neurospheres in addition to established glioma cell lines such as U251 because these grafted masses structurally resemble more to the tumor of origin. Intact antibodies are too large to cross readily the BBB[63] and indeed we observed that a disrupted BBB is needed for the LEM2/15 antibody to penetrate into the brain tumors. Accordingly,  $^{89}\text{Zr}$ -DFO LEM2/15 was able to detect orthotopically growing GBM implants from TS543 but not from U251, which correlates with the integrity of the BBB, as analyzed by Evans blue staining. More brain tumor models with different BBB leakage will be utilized in the future to test the tracer activity. However, this high dependence on the BBB integrity for targeting is a major limit for the use of intact LEM2/15 in clinical developments.

To overcome such a limitation, our current work is aimed at extending this initial findings using engineered and miniaturized derivatives of the LEM2/15 antibody. The miniaturized antibodies can enhance BBB penetration and therefore result in an improved tumor-targeted imaging[64]. Moreover labelling with PET isotopes characterized by short or intermediate half-lives such as  $^{68}\text{Ga}$ [65] would optimize the pharmacokinetics and facilitate wide access to this technology since  $^{68}\text{Ga}$  can potentially be generator-produced on site (rather than cyclotron produced). Besides, future studies with different tumor grades are needed to confirm the correlation between the MT1-MMP-targeted PET and the different tumor grades. Also, the demonstration of the feasibility of MT1-MMP as biomarker for tumor progression, able to discriminate between real and pseudoprogression after standard treatments, would be of great relevance for evaluating MT1-MMP-specific antibodies as non-invasive diagnostic tools in clinic.



In conclusion, we established the feasibility of the use of MT1-MMP-based immunoPET for an efficient detection of GBM and it opens the possibility of using engineered anti-MT1-MMP mAbs to more accurately biological characterization and diagnosis of GBM, as an alternate to non-specific tracers.

## Supporting Information

**S1 Fig. MT1-MMP expression in GBM patients.** **A)** MT1-MMP mRNA expression in the REMBRANDT dataset stratified by histology: Non-tumor ( $n = 28$ ), Oligodendroglioma ( $n = 67$ ), Astrocytoma ( $n = 147$ ) and GBM ( $n = 219$ ). Right panel: results of a Tukey's HSD post hoc test showing the differences between mean levels for each comparison and the 95% confidence interval. **B)** Same as in A) with the patients stratified by tumor grade: Grade II ( $n = 98$ ), Grade III ( $n = 85$ ), Grade IV ( $n = 130$ ). **C)** Kaplan Meier survival estimates of GBM patients in the REMBRANDT dataset stratified by the median MT1-MMP mRNA expression.

(TIF)

**S2 Fig.** **(A)** Hematoxylin and eosin (Left), immunohistochemistry with LEM2/15 antibody (Center) and ex vivo autoradiography (Right) of the U251 s.c. xenograft from mouse injected with  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15, indicating there was specific uptake in the U251 tumor. **(B)** Hematoxylin and eosin (Left), immunohistochemistry with LEM2/15 antibody (Center), and ex vivo autoradiography (Right) of the brain from a mouse with a TS543 orthotopic xenograft injected with  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15, confirming colocalization of the tracer with MT1-MMP expression.

(TIF)

**S3 Fig.** **(A)** Uptake of  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM2/15 and  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG1 as isotype control in orthotopic TS543 and U251 xenograft models, represented as %ID/g tumor (left panel) and tumor-to-blood ratio (right panel) at days 2 and 4 p.i. Data of tumor-to-blood ratios from TS543 tumors are also shown in Fig 4, they are included here just for comparison. Horizontal bars indicate medians. Red and blue lines represent  $\pm$ SDs in TS543 and U251 xenografts, respectively, ( $n = 3-5$ ). **(B)** Analysis of BBB integrity by quantification of intravenously administered Evans blue in the brain of mice with intact (●), mock surgery brains (■), orthotopic U251 (▲) and TS543 (▼) xenograft models. Horizontal bars indicate medians and vertical bars,  $\pm$ SDs ( $n = 3$ ).

(TIF)

**S1 Video.** PET-CT 3D render of a representative mouse bearing MT1-MMP+ GBM cells (U251), right flank, and MT1-MMP- breast cancer cells (MCF-7), left flank, labeled with  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 at 24 h post injection.

(MPG)

**S2 Video.** PET/CT 3D render imaging of a representative mouse bearing orthotopic xenograft containing patient-derived TS543 neurospheres and labeled with  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 at 24h after injection

(MPG)

## Acknowledgments

We thank Claudia Sofia Troncone for her expert technical assistance and Dr. Maria Blasco for the critical reading of the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AJS MS MAM JLMT FM. Performed the experiments: AJS AGL MO ER JAC. Analyzed the data: AJS MS AM MAM JLMT FM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AGA. Wrote the paper: MS AJS MAM AGA JLMT FM.

## References

1. Rasheed BK, Wiltshire RN, Bigner SH, Bigner DD. Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr Opin Oncol*. 1999; 11: 162–7. PMID: [10328589](#)
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114: 97–109. PMID: [17618441](#)
3. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 683–93. PMID: [12209157](#)
4. Nguyen QH, Szeto E, Mansberg R, Mansberg V. Paravertebral infection (phlegmon) demonstrated by FDG dual-head coincidence imaging in a patient with multiple malignancies. *Clin Nucl Med*. 2005; 30: 241–3. PMID: [15764879](#)
5. Becherer A, Karanikas G, Szabó M, Zettinig G, Asenbaum S, Marosi C, et al. Brain tumour imaging with PET: a comparison between [<sup>18</sup>F]fluorodopa and [<sup>11</sup>C]methionine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003; 30: 1561–7. PMID: [14579097](#)
6. Weber WA, Wester HJ, Grosu AL, Herz M, Dzewas B, Feldmann HJ, et al. O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-L-tyrosine and L-[methyl-<sup>11</sup>C]methionine uptake in brain tumours: initial results of a comparative study. *Eur J Nucl Med*. 2000; 27: 542–9. PMID: [10853810](#)
7. Singhal T, Narayanan TK, Jain V, Mukherjee J, Mantil J. <sup>11</sup>C-L-methionine positron emission tomography in the clinical management of cerebral gliomas. *Mol Imaging Biol*. 10: 1–18. PMID: [17957408](#)
8. Bradbury MS, Hambarzumyan D, Zanzonico PB, Schwartz J, Cai S, Burnazi EM, et al. Dynamic small-animal PET imaging of tumor proliferation with 3'-deoxy-3'-<sup>18</sup>F-fluorothymidine in a genetically engineered mouse model of high-grade gliomas. *J Nucl Med*. 2008; 49: 422–9. doi: [10.2967/jnumed.107.047092](#) PMID: [18287265](#)
9. Chandrasekaran S, Hollander A, Xu X, Benci JL, Davis JJ, Dorsey JF, et al. <sup>18</sup>F-fluorothymidine-pet imaging of glioblastoma multiforme: effects of radiation therapy on radiotracer uptake and molecular biomarker patterns. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 796029. doi: [10.1155/2013/796029](#) PMID: [23690748](#)
10. Rasey JS, Grierson JR, Wiens LW, Kolb PD, Schwartz JL. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med*. 2002; 43: 1210–7. PMID: [12215561](#)
11. Bruehlmeier M, Roelcke U, Schubiger PA, Ametamey SM. Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with <sup>18</sup>F-fluoromisonidazole and <sup>15</sup>O-H<sub>2</sub>O. *J Nucl Med*. 2004; 45: 1851–9. PMID: [15534054](#)
12. Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett*. 2003; 194: 1–11. PMID: [12706853](#)
13. Arroyo AG, Genís L, Gonzalo P, Matías-Román S, Pollán A, Gálvez BG. Matrix metalloproteinases: new routes to the use of MT1-MMP as a therapeutic target in angiogenesis-related disease. *Curr Pharm Des*. 2007; 13: 1787–802. PMID: [17584108](#)
14. Xie H, Xue Y, Liu L, Wang P, Liu Y, Ying H. Expressions of matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-14 associated with the activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human brain gliomas of different pathological grades. *Med Oncol*. 2011; 28 Suppl 1: S433–8. doi: [10.1007/s12032-010-9660-7](#) PMID: [20809186](#)
15. Wang L, Yuan J, Tu Y, Mao X, He S, Fu G, et al. Co-expression of MMP-14 and MMP-19 predicts poor survival in human glioma. *Clin Transl Oncol*. 2013; 15: 139–45. doi: [10.1007/s12094-012-0900-5](#) PMID: [22855183](#)
16. Wu K-P, Li Q, Lin F-X, Li J, Wu L-M, Li W, et al. MT1-MMP is not a good prognosticator of cancer survival: evidence from 11 studies. *Tumour Biol*. 2014; 35: 12489–95. doi: [10.1007/s13277-014-2567-8](#) PMID: [25195136](#)
17. Ulasov I, Yi R, Guo D, Sarvaiya P, Cobbs C. The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1846: 113–20. doi: [10.1016/j.bbcan.2014.03.002](#) PMID: [24657728](#)
18. Koziol A, Martín-Alonso M, Clemente C, Gonzalo P, Arroyo AG. Site-specific cellular functions of MT1-MMP. *Eur J Cell Biol*. 91: 889–95. doi: [10.1016/j.ejcb.2012.07.003](#) PMID: [22939226](#)

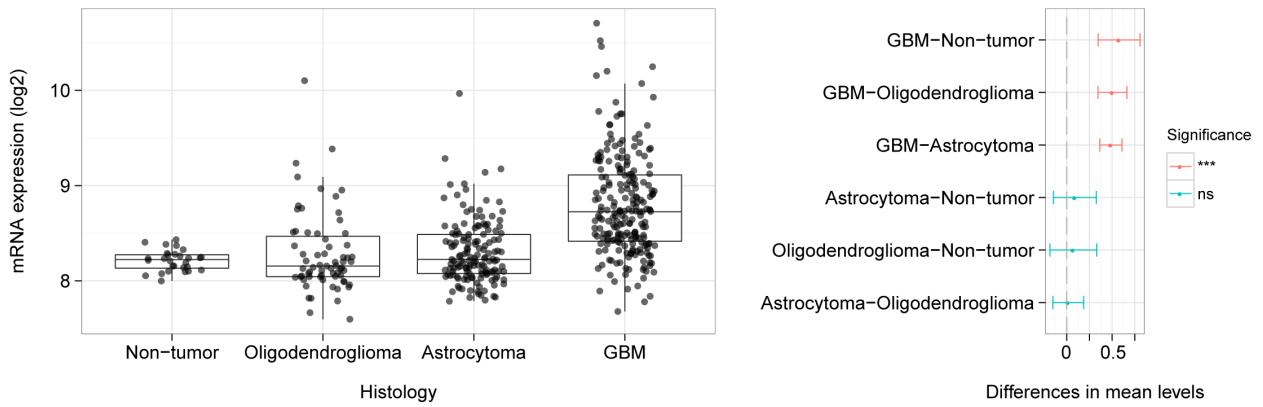
19. Itoh Y, Ito N, Nagase H, Evans RD, Bird SA, Seiki M. Cell surface collagenolysis requires homodimerization of the membrane-bound collagenase MT1-MMP. *Mol Biol Cell*. 2006; 17: 5390–9. PMID: [17050733](#)
20. Itoh Y, Seiki M. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol*. 2006; 206: 1–8. PMID: [15920734](#)
21. VanMeter TE, Rooprai HK, Kibble MM, Fillmore HL, Broaddus WC, Pilkington GJ. The role of matrix metalloproteinase genes in glioma invasion: co-dependent and interactive proteolysis. *J Neurooncol*. 2001; 53: 213–35. PMID: [11716072](#)
22. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature*. 1994; 370: 61–5. PMID: [8015608](#)
23. Levin VA, Phuphanich S, Yung WKA, Forsyth PA, Del Maestro R, Perry JR, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation. *J Neurooncol*. 2006; 78: 295–302. PMID: [16636750](#)
24. Groves MD, Puduvalli VK, Hess KR, Jaeckle KA, Peterson P, Yung WKA, et al. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 1383–8. PMID: [11870183](#)
25. Devy L, Huang L, Naa L, Yanamandra N, Pieters H, Frans N, et al. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-14 blocks tumor growth, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res*. 2009; 69: 1517–26. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-08-3255](#) PMID: [19208838](#)
26. Ingvarsen S, Porse A, Ericum C, Maertens L, Jürgensen HJ, Madsen DH, et al. Targeting a single function of the multifunctional matrix metalloproteinase MT1-MMP: impact on lymphangiogenesis. *J Biol Chem*. 2013; 288: 10195–204. doi: [10.1074/jbc.M112.447169](#) PMID: [23413031](#)
27. Gálvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG. Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem*. 2001; 276: 37491–500. PMID: [11448964](#)
28. Udi Y, Grossman M, Solomonov I, Dym O, Rozenberg H, Moreno V, et al. Inhibition mechanism of membrane metalloproteinase by an exosite-swiveling conformational antibody. *Structure*. 2015; 23: 104–15. doi: [10.1016/j.str.2014.10.012](#) PMID: [25482542](#)
29. Goldberg GI. Renaissance of MMPs as therapeutic targets? Maybe. *Structure*. 2015; 23: 6–7. doi: [10.1016/j.str.2014.12.003](#) PMID: [25565101](#)
30. Shimizu Y, Temma T, Sano K, Ono M, Saji H. Development of membrane type-1 matrix metalloproteinase-specific activatable fluorescent probe for malignant tumor detection. *Cancer Sci*. 2011; 102: 1897–903. doi: [10.1111/j.1349-7006.2011.02020.x](#) PMID: [21718387](#)
31. Zhu L, Wang H, Wang L, Wang Y, Jiang K, Li C, et al. High-affinity peptide against MT1-MMP for in vivo tumor imaging. *J Control Release*. 2011; 150: 248–55. doi: [10.1016/j.jconrel.2011.01.032](#) PMID: [21295090](#)
32. Kondo N, Temma T, Shimizu Y, Watanabe H, Higano K, Takagi Y, et al. Miniaturized antibodies for imaging membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancers. *Cancer Sci*. 2013; 104: 495–501. doi: [10.1111/cas.12102](#) PMID: [23305265](#)
33. Perk LR, Vosjan MJWD, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. p-Isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine: a new bifunctional chelate for facile radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for immuno-PET imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; 37: 250–9. doi: [10.1007/s00259-009-1263-1](#) PMID: [19763566](#)
34. Vosjan MJWD, Perk LR, Visser GWM, Budde M, Jurek P, Kiefer GE, et al. Conjugation and radiolabeling of monoclonal antibodies with zirconium-89 for PET imaging using the bifunctional chelate p-isothiocyanatobenzyl-desferrioxamine. *Nat Protoc*. 2010; 5: 739–43. doi: [10.1038/nprot.2010.13](#) PMID: [20360768](#)
35. Squatrito M, Vanoli F, Schultz N, Jasin M, Holland EC. 53BP1 is a haploinsufficient tumor suppressor and protects cells from radiation response in glioma. *Cancer Res*. 2012; 72: 5250–60. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-12-0045](#) PMID: [22915756](#)
36. Evans MJ, Holland JP, Rice SL, Doran MG, Cheal SM, Campos C, et al. Imaging tumor burden in the brain with 89Zr-transferrin. *J Nucl Med*. 2013; 54: 90–5. doi: [10.2967/jnumed.112.109777](#) PMID: [23236019](#)
37. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, Bowman RL, Sevenich L, Quail DF, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat Med*. 2013; 19: 1264–72. doi: [10.1038/nm.3337](#) PMID: [24056773](#)
38. Rosenbaum SE. Basic pharmacokinetics and pharmacodynamics. Inc JW& S, editor. Hoboken, N.Y.; 2011.

39. Canadas M, Embid M, Lage E, Desco M, Vaquero JJ, Perez JM. NEMA NU 4–2008 Performance Measurements of Two Commercial Small-Animal PET Scanners: ClearPET and rPET-1. *IEEE Trans Nucl Sci. IEEE*; 2011; 58: 58–65.
40. Manaenko A, Chen H, Kammer J, Zhang JH, Tang J. Comparison Evans Blue injection routes: Intravenous versus intraperitoneal, for measurement of blood-brain barrier in a mice hemorrhage model. *J Neurosci Methods*. 2011; 195: 206–10. doi: [10.1016/j.jneumeth.2010.12.013](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.12.013) PMID: [21168441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21168441/)
41. Madhavan S, Zenklusen J-C, Kotliarov Y, Sahni H, Fine HA, Buetow K, Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Mol Cancer Res*. 2009; 7: 157–67. doi: [10.1158/1541-7786.MCR-08-0435](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0435) PMID: [19208739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19208739/)
42. Deng R, Iyer S, Theil F-P, Mortensen DL, Fielder PJ, Prabhu S. Projecting human pharmacokinetics of therapeutic antibodies from nonclinical data: what have we learned? *MABs*. 3: 61–6. PMID: [20962582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962582/)
43. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352: 987–996. PMID: [15758009](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15758009/)
44. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*. 2009; 10: 459–466. doi: [10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7) PMID: [19269895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19269895/)
45. Young RM, Jamshidi A, Davis G, Sherman JH. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Ann Transl Med*. 2015; 3: 121. doi: [10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10](https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.05.10) PMID: [26207249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26207249/)
46. Mabray MC, Barajas RF, Cha S. Modern brain tumor imaging. *Brain tumor Res Treat*. 2015; 3: 8–23. doi: [10.14791/btrt.2015.3.1.8](https://doi.org/10.14791/btrt.2015.3.1.8) PMID: [25977902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25977902/)
47. Huang RY, Neagu MR, Reardon DA, Wen PY. Pitfalls in the Neuroimaging of Glioblastoma in the Era of Antiangiogenic and Immuno/Targeted Therapy “Detecting Illusive Disease, Defining Response. *Front Neurol*. 2015; 6: 33. doi: [10.3389/fneur.2015.00033](https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00033) PMID: [25755649](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25755649/)
48. Yang Y, Hernandez R, Rao J, Yin L, Qu Y, Wu J, et al. Targeting CD146 with a 64Cu-labeled antibody enables in vivo immunoPET imaging of high-grade gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112: E6525–34. doi: [10.1073/pnas.1502648112](https://doi.org/10.1073/pnas.1502648112) PMID: [26553993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26553993/)
49. Ulasov I, Borovjagin AV, Kaverina N, Schroeder B, Shah N, Lin B, et al. MT1-MMP silencing by an shRNA-armed glioma-targeted conditionally replicative adenovirus (CRAAd) improves its anti-glioma efficacy in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2015; 365: 240–50. doi: [10.1016/j.canlet.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.002) PMID: [26052095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26052095/)
50. Min K, Ji B, Zhao M, Ji T, Chen B, Fang X, et al. Development of a Radiolabeled Peptide-Based Probe Targeting MT1-MMP for Breast Cancer Detection. *PLoS One*. 2015; 10: e0139471. doi: [10.1371/journal.pone.0139471](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139471) PMID: [26437463](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26437463/)
51. Kondo N, Temma T, Deguchi J, Sano K, Ono M, Saji H. Development of PEGylated peptide probes conjugated with (18)F-labeled BODIPY for PET/optical imaging of MT1-MMP activity. *J Control Release*. 2015; 220: 476–83. doi: [10.1016/j.jconrel.2015.11.012](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.012) PMID: [26578437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26578437/)
52. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. In vivo biodistribution and accumulation of 89Zr in mice. *Nucl Med Biol*. 2011; 38: 675–81. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011) PMID: [21718943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21718943/)
53. Holland JP, Sheh Y, Lewis JS. Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl Med Biol*. 2009; 36: 729–39. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2009.05.007](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2009.05.007) PMID: [19720285](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19720285/)
54. Den Hollander MW, Bensch F, Glaudemans AWJM, Oude Munnink TH, Enting RH, den Dunnen WFA, et al. TGF-β Antibody Uptake in Recurrent High-Grade Glioma Imaged with 89Zr-Fresolimumab PET. *J Nucl Med*. 2015; 56: 1310–4. doi: [10.2967/jnumed.115.154401](https://doi.org/10.2967/jnumed.115.154401) PMID: [26135113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26135113/)
55. Sharma SK, Sevak KK, Monette S, Carlin SD, Knight JC, Wuest FR, et al. Preclinical 89Zr-immunoPET of High Grade Serous Ovarian Cancer and Lymph Node Metastasis. *J Nucl Med*. 2016;
56. Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci*. 2004; 93: 2645–68. PMID: [15389672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15389672/)
57. Verel I, Visser GWM, Boellaard R, Boerman OC, van Eerd J, Snow GB, et al. Quantitative 89Zr immuno-PET for in vivo scouting of 90Y-labeled monoclonal antibodies in xenograft-bearing nude mice. *J Nucl Med*. 2003; 44: 1663–70. PMID: [14530484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14530484/)
58. Oude Munnink TH, Arjaans MEA, Timmer-Bosscha H, Schröder CP, Hesselink JW, Vedelaar SR, et al. PET with the 89Zr-labeled transforming growth factor-β antibody fresolimumab in tumor models. *J Nucl Med*. 2011; 52: 2001–8. doi: [10.2967/jnumed.111.092809](https://doi.org/10.2967/jnumed.111.092809) PMID: [22072706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22072706/)
59. Kuo F, Histed S, Xu B, Bhadrasetty V, Szajek LP, Williams MR, et al. Immuno-PET imaging of tumor endothelial marker 8 (TEM8). *Mol Pharm*. 2014; 11: 3996–4006. doi: [10.1021/mp500056d](https://doi.org/10.1021/mp500056d) PMID: [24984190](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24984190/)

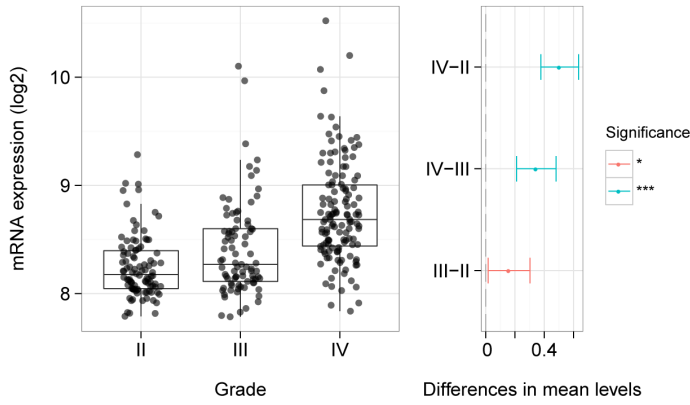
60. Deri MA, Zeglis BM, Francesconi LC, Lewis JS. PET imaging with  $^{89}\text{Zr}$ : from radiochemistry to the clinic. *Nucl Med Biol*. 2013; 40: 3–14. doi: [10.1016/j.nucmedbio.2012.08.004](https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2012.08.004) PMID: [22998840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22998840/)
61. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med*. 2003; 9: 713–25. PMID: [12778170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12778170/)
62. Genís L, Gonzalo P, Tutor AS, Gálvez BG, Martínez-Ruiz A, Zaragoza C, et al. Functional interplay between endothelial nitric oxide synthase and membrane type 1 matrix metalloproteinase in migrating endothelial cells. *Blood*. 2007; 110: 2916–23. PMID: [17606763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17606763/)
63. Lampson LA. Monoclonal antibodies in neuro-oncology: Getting past the blood-brain barrier. *MAbs*. 3: 153–60. PMID: [21150307](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21150307/)
64. Iqbal U, Albaghdadi H, Luo Y, Arbabi M, Desvaux C, Veres T, et al. Molecular imaging of glioblastoma multiforme using anti-insulin-like growth factor-binding protein-7 single-domain antibodies. *Br J Cancer*. 2010; 103: 1606–16. doi: [10.1038/sj.bjc.6605937](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605937) PMID: [20959824](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20959824/)
65. Smith DL, Breeman WAP, Sims-Mourtada J. The untapped potential of Gallium 68-PET: the next wave of  $^{68}\text{Ga}$ -agents. *Appl Radiat Isot*. 2013; 76: 14–23. doi: [10.1016/j.apradiso.2012.10.014](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2012.10.014) PMID: [23232184](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23232184/)

### Anexo 3. Figuras de material complementario

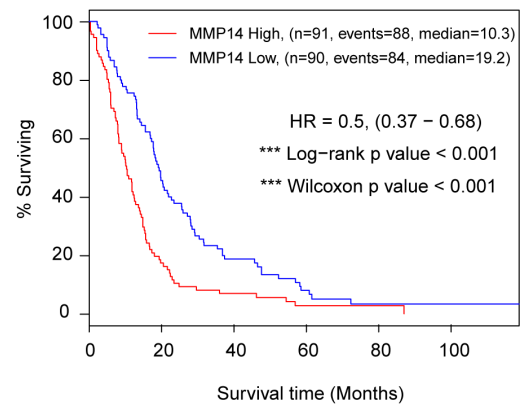
**A**



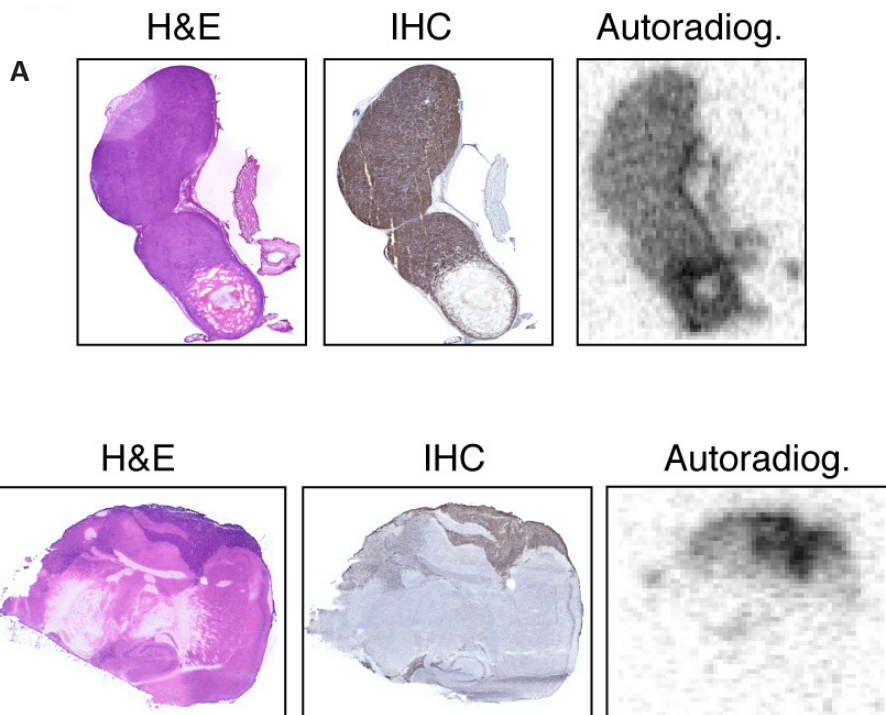
**B**



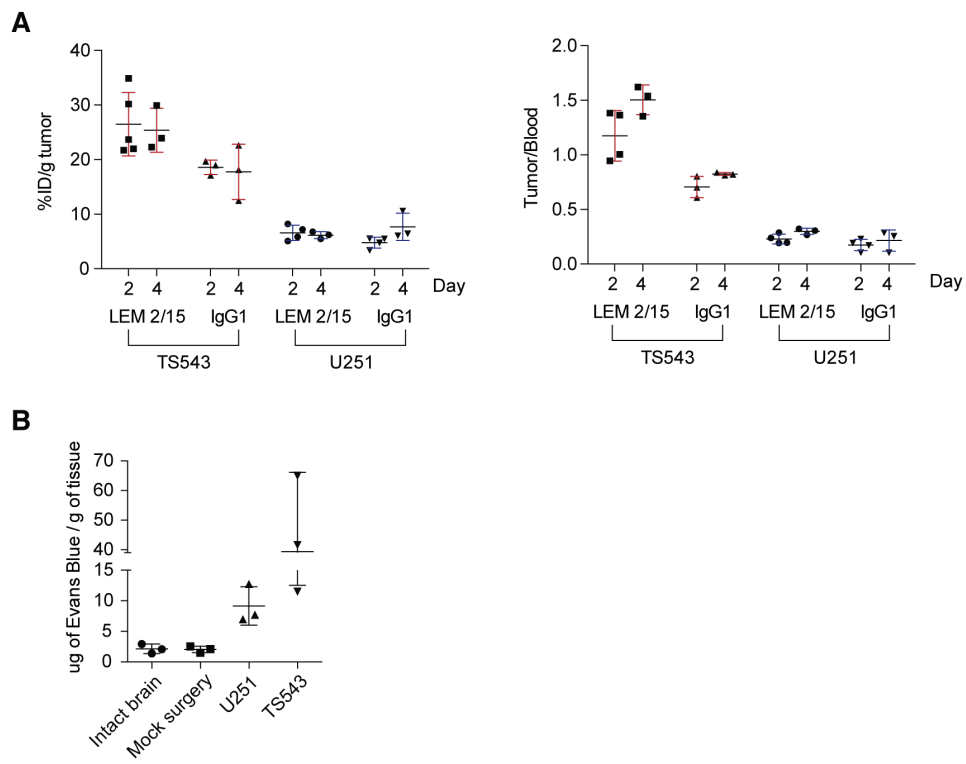
**C**



S1



S2



## Índice de tablas

Tabla 1.	Tipos de fragmentos de anticuerpo y sus principales características	26
Tabla 2.	Características de los principales radioisótopos utilizados en inmunoPET	27
Tabla 3.	Características del sistema microPET del equipo Argus microPET/CT	51
Tabla 4.	Características del sistema CT del equipo Argus PET/CT	52
Tabla 5.	Características de los algoritmos de reconstrucción del equipo Argus PET/CT	52
Tabla 6.	Estabilidad de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 incubado en suero y plasma humanos a 4 °C o 37 °C durante 7 días	61
Tabla 7.	Estabilidad de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG incubado en suero y plasma humanos a 4 °C o 37 °C durante 7 días	63
Tabla 8.	Datos de la biodistribución <i>ex vivo</i> de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (% ID/g) en varios tejidos de ratón del modelo xenograft de U251 y MCF7 (n = 14)	64
Tabla 9.	Parámetros farmacocinéticos del estudio de biodistribución <i>ex vivo</i> (n = 14) y PET (n = 14)	67
Tabla 10.	Parámetros farmacocinéticos de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 estimados mediante PET en el estudio longitudinal (n = 4)	67
Tabla 11.	Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal de U251 inyectado con $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 6) o $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (n = 4)	69
Tabla 12.	Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal de U251 inyectado con 20 µg (grupo 1, n = 4) o 65 µg (grupo 2, n = 6) de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15	70
Tabla 13.	Estudio de biodistribución <i>ex vivo</i> y PET a los 7 días posinyección de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 4), algunos con 1 mg de LEM 2/15 (n = 2), en ratones portadores de tumores CAPAN-2. Los valores se expresan como % ID/g	76
Tabla 14.	Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal de CAPAN-2 inyectado con $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 4) o bloqueado con 1 mg de LEM 2/15 e inyección de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 2)	77
Tabla 15.	Estudio de biodistribución <i>ex vivo</i> y PET a los 7 días posinyección de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 de ratones PDX de PDAC (n = 3) y control (n = 2). Los valores vienen dados por el % ID/g	81
Tabla 16.	Parámetros farmacocinéticos del estudio microPET/CT del modelo animal PDX de PDAC (n = 3) y grupo control (n = 2) tras la inyección de 20 µg de $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos	82



## Índice de figuras

- Figura 1. Ventajas y desventajas de las principales modalidades de imagen preclínica. De arriba abajo y de izquierda a derecha: tomografía axial computarizada del esqueleto de un ratón (CT), imagen por resonancia magnética de un corte axial de ratón perfundido con paraformaldehído a la altura del páncreas extraído de José L. Paredes *et al.* (2014) (MRI), imagen por ultrasonido o ecografía del tumor pulmonar de un ratón extraído de Florian Raes *et al.* (2016) (US), imagen de un anticuerpo radiomarcado en un tumor cerebral en un ratón (PET), imagen de un péptido radiomarcado en un modelo tumoral en ratón extraído de Qian Zhao (2013) (SPECT), e imagen de células tumorales en ratón por fluorescencia en un IVIS (OI). 18
- Figura 2. Esquema del flujo de trabajo en un estudio PET. Modificado de Gabriela Kramer-Marek y Jacek Capala (2012). 21
- Figura 3. Representación esquemática de un anticuerpo IgG. Ilustra la composición de cuatro cadenas y los dominios separados que comprende cada una. Extraído de Janeway Ch A *et al.* (2003). 23
- Figura 4. Estructura química de compuestos quelantes. **A.** EDTA, **B.** DTPA y **C.** DFO. Extraído de Melissa A. Deri *et al.* (2013). 26
- Figura 5. Esquema de las principales estrategias de conjugación de DFO. Izquierda, estrategias basadas en métodos de unión a través del grupo tiol de las cisteínas. Derecha, estrategias basadas en métodos que se unen a través del grupo amino de las lisinas. Modificado de Melissa A. Deri *et al.* (2013). 27
- Figura 6. **A.** Estructura de MT1-MMP. **B.** Mecanismos de corte y liberación de MT1-MMP autocatalíticos (izquierda) y no-autocatalíticos (derecha). 29
- Figura 7. Expresión de mRNA de MT1-MMP en diferentes tipos tumorales. Entre ellos se encuentran los gliomas y el cáncer de páncreas. Extraído de *Cancer Cell Line Encyclopedia* (2017). 29
- Figura 8. MMP en la metástasis de un tumor cerebral. Las MMP participan en muchos de los procesos metastásicos. **1.** Formación de células metastásicas del tumor primario. **2.** Intravasación de células metastásicas a la circulación sanguínea. **3.** Extravasación de células metastásicas a través de la barrera hematoencefálica en el cerebro. **4.** Migración de la célula tumoral en el cerebro. **5.** Las MMP contribuyen al microambiente y angiogénesis tumoral. Modificado de Ralf G. Rempe *et al.* (2016). 31
- Figura 9. Mecanismo de acción de LEM 2/15. Izquierda, MT1-MMP unida a la membrana plasmática realizando su actividad proteolítica sobre un sustrato. Derecha, al unirse LEM 2/15 se produciría un cambio conformacional que inhibiría el sitio alostérico de unión del sustrato y así la actividad de MT1-MMP. Extraído de Gregory I. Goldberg (2015). 32
- Figura 10. Imagen molecular de un tumor cerebral en un mismo paciente con tres modalidades de imagen. **A.** MRI, método de referencia en el diagnóstico de tumores cerebrales, **B.** PET con  $^{18}\text{F}$ -FDG, aunque la captación de glucosa es alta en el área tumoral, el contraste entre el tejido sano y el tejido tumoral no es el más adecuado, y **C.** PET

con  $^{11}\text{C}$ -MET, este tiene una captación más alta, más extensa y mejor contraste que la  $^{18}\text{F}$ -FDG. Extraído de Olivier Keunen *et al.* (2014).

34

Figura 11. Imágenes de tumores cerebrales mediante inmunoPET. **A.** Una imagen coronal (arriba) y una sagital (abajo) de un roedor portador de un tumor U87MG a las 48 horas posinyección de  $^{64}\text{Cu}$ -NOTA-YY146, extraído de Yunan Yang *et al.* (2015). **B.** Imágenes de dos pacientes en un estudio con  $^{89}\text{Zr}$ -fresolimumab: arriba, PET/RM con dos lesiones tumorales potenciadas por contraste, la lesión frontal derecha tiene una mayor captación del radiotrazador que la lesión paraventricular derecha que había sido previamente irradiada; y, abajo, un escáner PET de todo el cuerpo a los 4 días en un paciente con un glioma de alto grado, flecha, extraído de M. W. den Hollander *et al.* (2015). **C.** Imágenes de dos pacientes de un estudio pediátrico de DIPG con  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab: arriba, una imagen fusionada de PET con MRI potenciada en T1 con gadolinio a las 144 horas posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab, en la imagen se aprecia el tumor primario (flecha); y, abajo, imagen de fusión PET/MR de la médula espinal de un paciente con un tumor primario que ha desarrollado metástasis (flechas), extraído de M. H. Jansen *et al.* (2017).

35

Figura 12. Tira de cromatografía en capa fina instantánea de Biodex. La línea de origen, la línea separación de la sección 1 (muestra marcada) y 2 (radionúclido libre) y la línea del frente del solvente, de abajo arriba. La zona verde es un colorante que migra a la vez que el frente de la fase móvil para indicar que está cerca del final de la tira.

43

Figura 13. Equipo Argus microPET/CT en el Laboratorio de Imagen Molecular de la Unidad de Aplicaciones Biomédicas y Farmacocinética del CIEMAT, a la izquierda, el equipo operacional y, a la derecha, el equipo abierto donde pueden observarse los detectores de centelleo.

48

Figura 14. Maniquí de calidad de imagen del protocolo NEMA NU-4 2008. Fuente: web de Detection And Radiation Technologies, SL.

51

Figura 15. Interfaz de reconstrucción del *software* comercial del microPET/CT Argus. Para trabajar con parámetros cuantitativos hay que introducir la dosis inyectada en el momento inicial del PET, el SF y el peso del animal. Además, se puede realizar correcciones como *random*, *scatter* o atenuación.

52

Figura 16. Diagrama de flujo de trabajo de las imágenes obtenidas por el microPET/CT Argus. En azul están los procedimientos llevados a cabo con el programa comercial MMWKS, en negro los llevados a cabo por AMIDE, en verde los llevados a cabo por ITK-Snap y en marrón los llevados a cabo con 3DConvert.

53

Figura 17. Expresión de MT1-MMP en líneas celulares y neuroesferas de GBM. **A.** Western blot y **B.** Citometría de flujo. La línea celular SK-mel-103 se utilizó como control positivo de expresión de MT1-MMP y como control negativo se utilizaron las células sin ser teñidas por LEM 2/15.

57

Figura 18. Expresión de MT1-MMP mediante Western blot de la línea celular CAPAN-2 (adenocarcinoma de páncreas). Como control negativo de expresión se empleó la línea celular MCF7 de cáncer de mama.

57

Figura 19. Perfil de elución del anticuerpo LEM 2/15 conjugado sin purificar, posteriormente marcado con  $^{89}\text{Zr}$  y separado por una columna PD-10.

58

- Figura 20. Radiomarcaje de DFO-LEM 2/15 con  $^{89}\text{Zr}$ . **A.** Perfil de elución de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en la columna PD-10 y **B.** Autorradiografía de ITLC de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 purificado. En la sección 1 se localizaría la muestra de mAb marcado mientras que en la sección 2 estaría el radionúclido libre. 59
- Figura 22. Perfil de elución de la IgG inespecífica marcada con  $^{89}\text{Zr}$  a través de la PD-10. 60
- Figura 21. Estudio de inmunoreactividad por citometría de flujo. En el histograma se representa la intensidad de fluorescencia (x) frente al número de células normalizado como % de la señal máxima (y). 60
- Figura 23. Biodistribución *ex vivo* del modelo xenograft de U251 y MCF7 (n = 14). 62
- Figura 24. Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en ratones portadores de células U251 con expresión de MT1-MMP y células MCF-7 sin expresión de MT1-MMP (n = 14). **A.** Imágenes microPET/CT tomadas a los 1, 4 y 7 días posinyección. **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 por los tumores U251 y MCF7 (% ID/g). **C.** Ratio tumor/sangre. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). 63
- Figura 25. Estudios de regresión lineal para los datos extraídos por biodistribución *ex vivo* e imagen PET. **A.** Tumor de la línea celular U251 (azul) y MCF7 (rojo) y **B.** Pool sangre/corazón (PET) y sangre (*ex vivo*) (verde). 64
- Figura 26. Inmunohistoquímica del tejido tumoral de los ratones portadores de células U251 y MCF7. **A.** Corte de inmunohistoquímica de un tumor U251 teñido con LEM 2/15 positivo para MT1-MMP. Escala: 500  $\mu\text{m}$ . **B.** Corte de inmunohistoquímica de un tumor MCF7 teñido con LEM 2/15 negativo para MT1-MMP. Escala: 500  $\mu\text{m}$ . **C.** Corte de doble inmunotinción de un tumor U251 para MT1-MMP (rosa) y Ki67 (marrón). Escala: 50  $\mu\text{m}$ . **D.** Corte de doble inmunotinción de un tumor U251 para MT1-MMP (rosa) y CD31 (marrón). Escala: 50  $\mu\text{m}$ . 66
- Figura 27. Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 6) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (n = 4) en ratones portadores de células U251 que expresan MT1-MMP. **A.** Corte axial de imágenes microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (izquierda) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (derecha) inyectados a los 8 días. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) a los 1, 3, 6 y 8 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre de la captación de los anticuerpos radiomarcados. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). 67
- Figura 28. Estudio por histología, inmunohistoquímica y autorradiografía de los tumores xenografts heterotópicos subcutáneos de U251. Tinción hematoxilina y eosina (H&E), inmunohistoquímica realizada con el anticuerpo LEM 2/15 (IHC) y autorradiografía (ARG). 68
- Figura 29. Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (n = 6) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (n = 3) en ratones portadores de células TS543 que expresan MT1-MMP. **A.** Corte axial de imágenes microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (izquierda) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (derecha) inyectados a los 6 días. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) a los 1, 3 y 6 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre de la captación de los anticuerpos radiomarcados. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)). 69

- Figura 30. Estudios de microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 5$ ) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $n = 5$ ) en ratones portadores de células U251 que expresan MT1-MMP implantadas intracranealmente. **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) a los 2 y 4 días posinyección con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (izquierda) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (derecha). **B.** Captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) en modelos ortotópicos de U251 a los 2 y 4 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre de la captación de los anticuerpos radiomarcados. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) 70
- Figura 31. Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 5$ ) y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica ( $n = 3$ ) en ratones portadores de células TS543 que expresan MT1-MMP implantadas intracranealmente. **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) a los 2 y 4 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Estudio cuantitativo de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 y  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-IgG inespecífica (% ID/g) en modelos ortotópicos de TS543 a los 2 y 4 días posinyección. **C.** Ratio tumor/sangre. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) 71
- Figura 32. Estudio por histología, inmunohistoquímica y autorradiografía de los tumores ortotópicos de TS543. **A.** Imágenes del cerebro con una doble tinción para MT1-MMP y un marcador vascular (CD31) o tumoral (Ki67). **B.** Hematoxilina y eosina (H&E), inmunohistoquímica con LEM 2/15 y autorradiografía (ARG) de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 que confirma la colocalización del radiotrazador con la expresión de MT1-MMP. 72
- Figura 33. Estudios microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 ( $n = 4$ ), algunos con 1 mg de LEM 2/15 ( $n = 2$ ), en ratones portadores de células CAPAN-2. **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) de ratones inyectados con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (mitad superior) o  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 bloqueado con LEM 2/15 (mitad inferior) a los 1, 5 y 7 días posinyección. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Captación tumoral (expresada en % ID/g) en modelos de CAPAN-2 a los 1, 3, 5 y 7 días posinyección; también se muestra la captación obtenida ex vivo. **C.** Ratio tumor/sangre a los 1, 3, 5 y 7 días posinyección. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) 73
- Figura 34. Estudio de inmunohistoquímica de los tumores xenografts heterotópicos subcutáneos de CAPAN-2 por LEM 2/15 (marrón). En la sección superior se puede observar la distribución de la MT1-MMP fundamentalmente en el borde del tumor (escala: 1000  $\mu\text{m}$ ), y en la sección inferior se muestra una ampliación (escala: 50  $\mu\text{m}$ ). 75
- Figura 35. Inmunohistoquímica de diversas muestras de adenocarcinomas ductales de páncreas de pacientes, utilizando LEM 2/15 como agente de tinción para evaluar la expresión de MT1-MMP. A la derecha se observa la tinción de la muestra PANC198, positiva para la metaloproteasa, frente a una muestra de páncreas de un paciente sano (a la izquierda). 76
- Figura 36. Análisis de la expresión de MT1-MMP en ratones xenograft metastásicos para PDAC. (Arriba) Sección de un tumor PDAC con potencial metastásico implantado ortotópicamente en ratones hembras NSG. La presencia de células tumorales humanas se visualiza fácilmente en el tejido del ratón mediante la sobreexpresión de MT1-MMP

(izquierda) y su colocalización con el marcador humano (derecha). (Abajo) Sección de hígado marcada con sonda ALU (derecha) y LEM 2/15 (izquierda). Escala: 1000  $\mu\text{m}$ .

77

Figura 37. Estudios de microPET/CT de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en un modelo ortotópico de un PDX de PDAC (n = 3) y animales control (n = 2). **A.** Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) de ratones portadores de un tumor ortotópico (mitad superior) o control (mitad inferior) a los 1, 5 y 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Los tumores están marcados con flechas. **B.** Estudio cuantitativo de la captación de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 (% ID/g) en modelos ortotópicos y animales control a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección, además de *ex vivo* el 7 día. **C.** Ratio tumor/sangre a los 1, 2, 4 y 7 días posinyección, además de *ex vivo* el 7 día. Diferencias estadísticamente significativas:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) y  $p < 0,001$  (\*\*\*).

78

Figura 38. Análisis de la expresión de MT1-MMP en ratones PDX y control mediante inmunohistoquímica con LEM 2/15. **A.** Tejido de tumor implantado en el páncreas de un roedor donde se observa la expresión de MT1-MMP en células tumorales (marrón). **B.** Páncreas de un ratón control. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

80

Figura 39. Estudios de microPET/CT con  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15 en un modelo de metástasis de un tumor derivado de un paciente con PDAC (mitad superior) y en un ratón control NSG (mitad inferior). Corte axial (arriba) y corte sagital (abajo) de un modelo de metástasis en ratón o control a los 1, 5 y 7 días posinyección de  $^{89}\text{Zr}$ -DFO-LEM 2/15. Los tumores están marcados con flechas.

81

Figura 40. Análisis de la expresión de MT1-MMP mediante inmunohistoquímica con LEM 2/15 en el modelo metastásico de PDX. **A.** Tejido de tumor implantado en el páncreas de un roedor donde puede observarse la expresión de MT1-MMP (marrón). **B.** Tejido de hígado. **C.** Tejido de pulmón donde puede observarse la expresión de MT1-MMP en pequeñas metástasis. Escala: 50  $\mu\text{m}$ .

82