

00562

7
14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA FACULTAD DE QUIMICA

ANTICUERPOS COMO ACARREADORES DE
DROGAS CITOTOXICAS

TESIS

Que para optar por el grado de Maestro
en Ciencias Químicas (Bioquímica)

Presenta

Rosa María Montoya Herrera

TESIS CON
FALLA EN ORIGEN

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| INTRODUCCION | 1 |
| OBJETIVO | 9 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL | 10 |
| MATERIAL Y METODOS | 14 |
| I. Fijación de 5-FU, MTX y CTA a IgG bovina y a anticuerpos anti-DNP de borrego por diálisis en equilibrio | 14 |
| II. Fijación de 5-FU, MTX y CTA a anticuerpos anti-DNP desnaturalizados reversiblemente | 24 |
| RESULTADOS | 28 |
| I. Fijación de 5-FU, MTX y CTA a IgG bovina | 28 |
| II. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP | 34 |
| III. Efecto del pH en la fijación de 5-FU, MTX y CTA a anticuerpos anti-DNP | 36 |
| IV. Efecto de la desnaturalización reversible de anticuerpos en la fijación de 5-FU, MTX y CTA a anticuerpos anti-DNP | 55 |
| DISCUSION | 66 |
| I. Fijación de 5-FU, MTX y CTA a IgG bovina | 66 |
| II. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP | 67 |
| III. Efecto del pH en la fijación de 5-FU, MTX y CTA a anticuerpos anti-DNP | 70 |
| IV. Efecto de la desnaturalización reversible de anticuerpos en la fijación de 5-FU, MTX y CTA a anticuerpos anti-DNP | 71 |
| CONCLUSION | 73 |
| BIBLIOGRAFIA | 75 |
| APENDICE I | 82 |
| Agentes citotóxicos que han sido unidos a anticuerpos | |
| APENDICE II | 91 |
| Fijación de moléculas pequeñas a macromoléculas | |
| APENDICE III | 103 |
| Diálisis en equilibrio | |
| APENDICE IV | 106 |
| Desnaturalización reversible de anticuerpos | |

INTRODUCCION

El transporte de sustancias con actividad biológica hacia sitios específicos del organismo, o blancos, ha cobrado interés en los últimos años porque promete alcanzar concentraciones adecuadas en un área precisa sin exponer otras a las drogas, y porque ahora se dispone con facilidad de proteínas acarreadoras de gran especificidad de blancos (anticuerpos). La utilidad de este enfoque terapéutico es particularmente evidente en la quimioterapia del cáncer por medio de drogas citotóxicas; la que es obstaculizada porque la mayoría de las drogas interaccionan tanto con células tumorales como con células normales propiciando relaciones costo/beneficio por demás ambiguas (1).

El acarreador ideal de drogas citotóxicas habría de ser no tóxico en sí, biodegradable, y de tamaño y forma apropiadas para adaptarse a una amplia variedad de sustancias. Además, un acarreador efectivo debería ser específico para el blanco y alcanzarlo "in vivo" en cantidades adecuadas, poseer propiedades bioquímicas adecuadas para que el agente tóxico pueda unirse sin afectar su especificidad y al mismo tiempo conservar la actividad de la droga, y no ser inactivado durante su camino desde el punto de administración hasta alcanzar su blanco.

En la búsqueda de un acarreador ideal se han probado varios sistemas con distintos objetivos terapéuticos (Tabla I) (2). En cuanto a cáncer se han usado varias clases de acarreadores de agentes citotóxicos, tanto específicos como no específicos (3-7).

Entre los acarreadores no-específicos tenemos a liposomas, eritrocitos-DNA, fibrinógeno, albúmina y otras macromoléculas sintéticas (Tabla I). Aunque estas moléculas carecen de especificidad se ha reportado que agentes citotóxicos conjugados a ellas han tenido cierto incremento en su efectividad terapéutica. El incremento ha sido atribuido a: Inhibición del catabolismo de la droga por acción del acarreador, lenta liberación de la droga porque el conjugado actúa como depósito, preservación de la forma activa de la droga (liposomas). El uso de estos acarreadores inespecíficos para la terapia del cáncer está basado en la observación de que muchos tipos de células tumorales tienen una alta actividad endocítica que permite una mayor captación de conjugados droga-macromolécula por las células tumorales en relación a las normales.

Los acarreadores específicos incluyen lectinas, hormonas y anticuerpos. Las lectinas son usadas debido a su habilidad para reconocer y enlazarse a complejos específicos de carbohidratos en la superficie de las células (8). Muchas lectinas tienen dos o más sitios de enlace, los cuales forman puentes intracelulares y causan aglutinación. También las lectinas propician la asociación de moléculas superficiales en un polo de la célula blanco promoviendo la endocitosis (8). Se ha postulado que las lectinas se enlazan preferentemente a células neoplásicas, pero sólo a aquéllas que tienen receptores adecuados (8, 9 y 10). Puesto que las hormonas tienen un alto grado de especificidad para sus células blanco también han sido usadas como acarreadores de drogas citotóxicas, aunque no funcionan para todos los tipos de células malignas (11). Los anticuerpos, por ser fácilmente producibles, tienen una alta especificidad

TRANSPORTE DE DROGAS

ACARREADOR

DROGAS ASOCIADAS AL ACARREADOR

Macromoléculas

Inmunoglobulinas

Methotrexate, daunomicin, clorambucil
I¹³¹, toxina diftérica, glucooxidasa, etc.

Glicoproteínas desializadas

Lisosima, albúmina.

Albumina

Amanitina, Faloidina, ácido deoxicólico.

Fibrinógeno

Dicloroetilfosforamida.

Acido Desoxirribonucléico

Daunomicin, adriamicin.

Dextran

Insulina, noradrenalina, anfetamina, no-
vocaína, coenzima B₁₂.

Células

Eritrocitos

β -glucosidasa, β -galactosidasa, glucuroni-
dasa, asparaginasa, glucooxidasa, metho-
trexate, adriamicin.

Leucocitos

Enzima correctiva.

Hepatocitos

Uridin difosfato gluconiltransferasa.

Sistemas sintéticos no-biode- gradables.

Microcápsulas de nylon semi-
permeable

Anhidrasa carbónica, uricasa, asparagi-
nasa, ureasa, catalasa.

Gel de poliacrilamida

Asparaginasa.

Membranas de líquidos sur-
factantes

Ureasa.

Perlas de vidrio

Uricasa.

Sistemas sintéticos biodegradables

Microesferas de albúmina

6-mercaptopurina, actinomicin D.

Emulsiones de aceites

Naltrexona.

Polímeros de ácido láctico

Ciclazocina

Ufasomas (esferas de ácido gra-
sos no saturados).

Liposomas

Lisosima, amiloglucosidasa, neuraminidasa, α -manosidasa, glucocerebrósido, β -glucosidasa, hexosaminidasa A, asparaginasa, peroxidasa, glucosaoxidasa, lecitinas, inmunoglobulinas, insulina, toxoide diftérico, Poli (I): Poli (C), actinomicín D, 5-fluorouracilo, methotrexate, bleomicín, citosin arabinósido, 8-azaguanina, mecloretamina, bicloroetil nitrosourea, colchicina, penicilina G, esteroides, AMP cíclico, pepstatina, glutamato, nitroblue terazolium, EDTA, DTPA, TcO_4 .

Tabla I. Transporte de drogas en biología y medicina
Gregory Gregoriadis, Nature 265, 3:407-410, 1977.

y una gran afinidad para el antígeno, son considerados como los más adecuados para funcionar como transportadores específicos de agentes tóxicos.

Se han utilizado anticuerpos ligados a agentes citotóxicos en contra de microbios invasores (12), parásitos (13), timocitos (14,15), y desde luego en contra de células neoplásicas (Apéndice I). Ya desde principios de 1900 Erlich (16) estuvo fascinado por la posibilidad de usar toxina diftérica unida a anticuerpos antitumorales como una "Bala Mágica" en contra de enfermedades malignas. Pero en ese tiempo no fue posible fabricar la "Bala Mágica" debido a las dificultades para identificar y producir anticuerpos adecuados. Más tarde, con el avance en la preparación de anticuerpos de gran pureza y con el desarrollo de la metodología para unir micromoléculas a proteínas, se ha hecho técnicamente posible la terapia experimental en contra de tumores por medio de conjugados droga-anticuerpos antitumorales (17-52) (Apéndice I).

Sobre el mecanismo de acción de los conjugados droga-anticuerpo se han hecho varias consideraciones dependiendo del mecanismo de acción de la droga:

Si la droga aún siendo parte integral del conjugado tiene acción en la superficie celular como intracelularmente, es posible que no necesite ser liberada del conjugado para que ejerza su acción citotóxica. Se ha visto que el clorambucil unido a anticuerpos puede dañar membranas plasmáticas (21,24). También existe daño celular cuando se adicionan al conjugado agentes con actividad superficial como fosfolipasas, asparaginasa o ciertas toxinas bacterianas (52).

Otra alternativa es que la droga, o un fragmento activo péptido-droga, necesiten ser liberados para que puedan tener actividad citotóxica. En la superficie de células transformadas (53) y en los alrededores de áreas necróticas del tumor, hay un incremento en la actividad proteolítica que podría facilitar la liberación de las drogas acarreadas. Algunos ejemplos son los conjugados con ciclofosfamida que tienen actividad una vez que la droga se ha liberado (3), análogos de purinas y pirimidinas que necesitan estar libres para su activación por enzimas apropiadas en los tejidos blanco. El efecto de la activación enzimática de drogas enlazadas a inmunoglobulinas aún no está estudiado.

Para drogas que tienen efecto citotóxico intracelularmente, se requiere que el conjugado droga-anticuerpo sea internalizado por las células utilizando sus sistemas de transporte específico, o por difusión pasiva, pinocitosis o fagocitosis. La internalización de los conjugados se puede llevar a cabo por medio de los mecanismos que operan para la droga o para el anticuerpo, y si un proceso no está saturado por el otro, una mayor concentración intracelular puede ser alcanzada por la administración simultánea del conjugado y cantidades tolerables de droga libre. Sin embargo, no se sabe con certidumbre si los conjugados pueden utilizar sistemas de transporte específicos para la droga, ya que el enlace droga-anticuerpo puede cambiar el transporte intracelular debido a la falla del receptor para reconocer a la droga, o, por falta de habilidad de la proteína transportadora para internalizar al conjugado receptor-droga-anticuerpo. Otro mecanismo que permite la entrada de los conjugados a la

célula, es la endocitosis, la que ocurre después de la polarización de los anticuerpos fijados a receptores en la membrana celular (27).

En cuanto a los métodos de unión de agentes citotóxicos a anticuerpos, se han usado unos basados en las técnicas desarrolladas para conjugar haptenos a diferentes acarreadores, y otros en técnicas químicas empleadas para la modificación y formación de enlaces cruzados entre macromoléculas.

Los grupos funcionales de la inmunoglobulinas, disponibles para ligar agentes citotóxicos son grupos carboxilos y aminos terminales o periféricos, sulfhidrilo, guanidino de las argininas, el anillo imidazol, y los grupos fenólicos de las tirosinas. Las condiciones para el acoplamiento dependen de los grupos funcionales de la droga, de tal manera que se enlacen sin afectar su actividad tóxica. Por ejemplo, si un grupo carboxilo libre es esencial para la citotoxicidad de la droga, el uso de una carbodiimida para enlazarla a un grupo nucleofílico en el anticuerpo podría hacerla perder su actividad (54).

Se han ligado covalentemente con cierto éxito agentes citotóxicos a anticuerpos por medio de carbodiimidas hidrosolubles, reactivos bifuncionales, particularmente glutaraldehído, así como p-p'-difluoro m,m'-dinitrofenilsulfona, dimetil adipimidato, metil 4-mercaptobutirimidato y bisoxirano; también se han usado sales de diazonio, bases de Schiff y N-acetilhomocisteinatio-lactona.

La posibilidad de enlaces débiles entre agentes citotóxicos y anticuerpos para formar conjugados no-covalentes no ha sido estudiada ampliamente. Su importancia radica en que los agentes ligados de esta manera a los anticuerpos

son liberados más fácilmente en el sitio blanco. Estudios preliminares sugieren que conjugados de clorambucil ligados no-covalentemente a inmunoglobulinas, resultan más potentes para inhibir a un tumor que los conjugados covalentes preparados con una carbodiimida hidrosoluble.

Otra manera de formar conjugados ha sido mediante un brazo o puente entre el agente citotóxico y el anticuerpo. Por medio de carbodiimidas hidrosolubles se adicionan uno o más aminoácidos a la droga y posteriormente se unen al anticuerpo. Los imidoésteres bifuncionales también pueden ser usados para incorporar grupos espaciadores entre las moléculas reactivas. El ácido poliglutámico y las dextranas han sido empleadas para ligar agentes alquilantes a anticuerpos (48). Se espera que este método puede permitir altas cantidades de droga ligada al anticuerpo sin pérdida de la actividad de la droga ni del anticuerpo, y podría hacer posible la introducción de más de un tipo de agente citotóxico en la misma molécula de anticuerpo permitiendo una quimioterapia combinada.

OBJETIVO

Esta tesis se enfoca a la búsqueda de conjugados no-covalentes de drogas citotóxicas con anticuerpos a fin de potenciar la actividad biológica de ambos.

Un enlace no-covalente de la droga con el anticuerpo luce más efectivo que los covalentes por su relativa facilidad de disociación. Además los conjugados covalentes droga-anticuerpo deben ser transportados al interior de la célula y catabolizados por enzimas lisosomales antes de producir fragmentos activos. Entonces, los conjugados covalentes requieren de una dinámica de eventos mucho más compleja que la que necesitan los no-covalentes para liberar la droga activa en el sitio blanco.

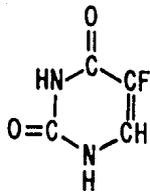
A diferencia de otros estudios aquí prestamos especial atención a los aspectos fisicoquímicos del enlace droga-anticuerpo, los que determinan el número de moléculas citotóxicas que eventualmente llegan a un tumor. Asimismo exploramos las condiciones fisicoquímicas adecuadas para establecer un máximo de enlaces no-covalentes entre la droga citotóxica y el anticuerpo.

DISEÑO EXPERIMENTAL

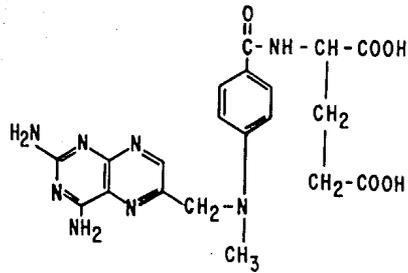
En la formación de los conjugados no-covalentes se buscó la asociación droga-anticuerpo de las siguientes maneras:

- a) Estableciendo interacciones por medio de fuerzas débiles del tipo de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbica entre las drogas y los residuos de aminoácidos periféricos del anticuerpo.
- b) Formando complejos de inclusión desdoblado el anticuerpo y dejando que recupere su estructura terciaria en presencia de la droga, para que ésta interactúe con los residuos de aminoácidos internos y quede atrapada dentro de las fuerzas que estabilizan la estructura nativa del anticuerpo.

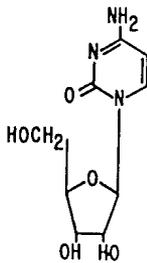
Se emplearon varias drogas citotóxicas en base a su estructura química, de tal manera que se favoreciera la interacción no-covalente droga-anticuerpo, evitando drogas con grupos químicos fuertemente electrofílicos pues éstos formarían enlaces covalentes con facilidad con grupos nucleofílicos de la molécula de anticuerpo. Se usaron tres drogas citotóxicas; 5-Fluorouracilo (5-FU), Methotrexate (MTX) y Citosin Arabinósido (CTA) (figura 1). Se seleccionaron estas drogas por ser unas de las más empleadas en la quimioterapia del cáncer así como por la disponibilidad en el mercado de sus formas radiactivas.



5-FLUOROURACILO



METHOTREXATE



CITOSIN ARABINOSIDO

Figura 1. Drogas citotóxicas utilizadas para los estudios de fijación a IgG y anticuerpos anti-DNP.

Como acarreadores se usaron dos tipos de anticuerpos: inmunoglobulinas G bovinas normales (IgG) para disminuir la heterogeneidad ocasionada por diferentes clases de Igs. y anticuerpos anti-dinitrofenol (anti-DNP) de borrego, con el fin de estudiar la influencia de la droga sobre el sitio activo del anticuerpo.

El trabajo se dividió en dos partes:

- I. Búsqueda de la formación de conjugados entre 5-FU, MTX y CTA con IgG a pH=7.2; y de las mismas drogas con anticuerpos anti-DNP a diferentes pHs (pH=5, 6, 7.2, 8 y 9).

En esta fase del trabajo la formación de conjugados droga-anticuerpo se buscó por diálisis en equilibrio (Apéndice III) y el tratamiento de los datos se hizo por los métodos de Scatchard y Sips (Apéndice II) obteniéndose de esta manera los valores de la constante de asociación (K) entre la droga citotóxica y el anticuerpo, la concentración molar total de sitios de fijación para la droga ($[S_0]$) y el número de moléculas de droga que se fijan por molécula de anticuerpo (n).

- II. Búsqueda de la formación de conjugados entre 5-FU, MTX y CTA con anticuerpos anti-DNP desnaturalizados reversiblemente con clorhidrato de guanidina (GuHCl) y con calor (Apéndice IV) y renaturalizados en presencia de las drogas.

La desnaturalización y renaturalización de los anticuerpos se siguió por cambios en la rotación específica, ya que la mayoría de las proteínas globulares presentan una rotación específica en el rango de -30 a -70° , en su

estado nativo y este valor es disminuido de 20 a 60° por la desnaturalización. La detección de la formación de conjugados se hizo por cromatografía de exclusión esperando encontrar un pico radiactivo en el volumen de exclusión del gel en caso de haber formación de conjugados. También se detectaron los conjugados por doble inmunodifusión (DID) seguida de fluorografía para observar incorporación de radiactividad en las bandas de precipitación al estar unida la droga con el anticuerpo.

MATERIAL Y METODOS

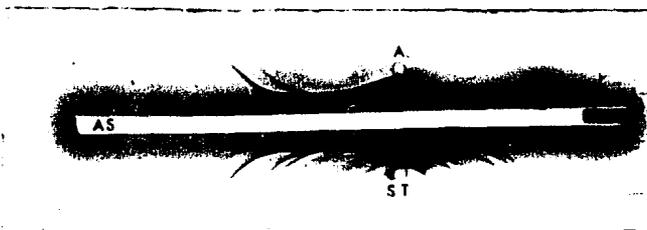
I. FIJACION DE 5-FU, MTX Y CTA A IgG BOVINA Y A ANTICUERPOS ANTI-DNP DE BORREGO POR DIALISIS EN EQUILIBRIO.

Se hicieron experimentos de diálisis en equilibrio entre IgG bovina a una concentración de $2.68 \times 10^{-5} \text{ M}$ y cada una de las drogas citotóxicas a $\text{pH}=7.2$ en PBS. También se hicieron diálisis en equilibrio entre 5-FU, MTX, CTA y anticuerpos anti-DNP de borrego a $\text{pH}=5, 6, 7.2, 8$ en PBS y a $\text{pH}=9$ en buffer de carbonatos. Las concentraciones de anticuerpos fueron: $1.25 \times 10^{-5} \text{ M}$, $4.12 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $1.45 \times 10^{-5} \text{ M}$. Estas dos últimas concentraciones sólo se probaron para los experimentos de diálisis en equilibrio a $\text{pH}=7.2$ entre 5-FU y anticuerpos anti-DNP.

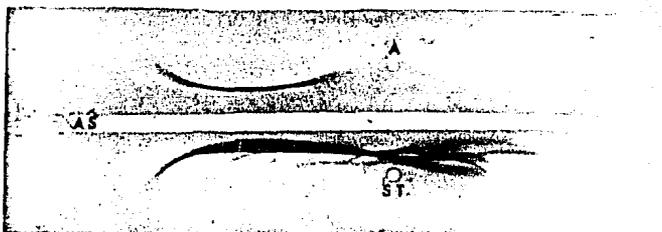
1) PREPARACION DE REACTIVOS:

IgG bovina normal. Se obtuvo de laboratorios Miles y fue repurificada por cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa (55,56), dando una sola banda correspondiente a IgG por inmunoelectroforesis (Figura 2). Los experimentos de diálisis en equilibrio se hicieron con esta IgG en PBS (buffer de fosfatos 0.01 M, cloruro de sodio 0.15 M, $\text{pH}=7.2$).

Soluciones de 5-FU. Se prepararon soluciones de $5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ de 5-FU (Sigma) en PBS $\text{pH}=5, 6, 7.2, 8$ y a $\text{pH}=9$ en buffer de carbonatos 0.026 M y 0.15 M de cloruro de sodio. A partir de cada una de estas soluciones se hicieron 12 diluciones de 1 ml con una alícuota de 0.1 ml de 5-Fluoro ($6\text{-}^3\text{H}$) Uracilo (The Radiochemical Centre Amersham), con una concentra-



(a)



(b)

Figura 2. Inmunolectroforesis en agar de γ -globulina bovina de laboratorios Miles. En los pozos superiores se depositó la γ -globulina bovina (A) y el antisero bovino (AS) en los canales. En los pozos inferiores hay suero total bovino (ST). En la figura (a) se observan las bandas de precipitación de la γ -globulina G y de otras contaminantes tal vez de γ -globulina A y albúmina. En la figura (b) se observa una sola banda de γ -globulina G después de la purificación en DEAE-celulosa.

ción final de 1.0×10^{-6} M y actividad específica de 1.0 Ci/mmol. La relación de 5-FU a ^3H -5-FU fue variable, y el rango de concentración final fue de 4.6×10^{-5} a 2.9×10^{-8} M.

Soluciones de MTX. También se prepararon 12 diluciones de 1 ml cada una a pH=5, 6, 7.2, 8 y 9 de MTX (Sigma) con una concentración inicial de 4.18×10^{-3} M y alícuotas de 0.1 ml de Methotrexate (^3H , $^7\text{-}^3\text{H}$) (The Radiochemical Centre Amersham) con una concentración final de 1.2×10^{-6} M y actividad específica de 250 mCi/mmol. El rango de concentración final total de la mezcla fue de 3.8×10^{-3} a 1.31×10^{-7} M.

Soluciones de CTA. Se utilizó una concentración inicial de 1.0×10^{-2} M de CTA (Sigma) mezclado con 2.96×10^{-8} M de Citosin- β -D-Arabinósido ($^5,6\text{-}^3\text{H}$) New England Nuclear) con actividad específica de 13.2 Ci/mmol. Se prepararon 12 diluciones de la droga a cada pH en un rango de concentración final de 0.09×10^{-2} a 6.90×10^{-8} M.

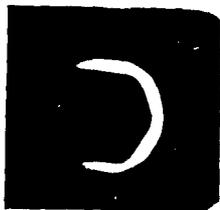
La radiactividad final (cuentas por minuto) en cada una de las diluciones se estimó en un contador de centelleo líquido Mark III de Searie. Tomando una alícuota de 50 μl y mezclándola con 5 ml de líquido de centelleo Bray (60g Naftaleno, 0.2g POPOP, 4g PPO, 100 ml Metanol, 20 ml Etilen glicol, aforar a 1 litro con Dioxano).

Anticuerpos anti-DNP. Se estimuló a un borrego previamente inmunizado contra DNP, con 5 mg de un conjugado DNP_{32} HSA (Albúmina sérica humana dinitrofenilada), sangrándose a los 8 días. Para separar el suero, la sangre se dejó coagular 12 horas a temperatura ambiente y 12 horas a

4°C, y posteriormente se centrifugó. La actividad anti-DNP del suero se probó por doble inmunodifusión (DID) contra un conjugado DNP₂₇GGB (Gamma globulina bovina dinitrofenilada) (Figura 3).

Los anticuerpos anti-DNP fueron obtenidos a partir del suero por cromatografía de afinidad. Con este objeto se activó Sepharosa 4 B (Pharmacia Chemical) con bromuro de cianógeno y se le acopló DNP-lisina (58). Se dejó incubando el suero con la Sepharosa-DNP durante 12 horas a temperatura ambiente, se lavaron las proteínas inespecíficas exhaustivamente con PBS y los anticuerpos anti-DNP pegados a la Sepharosa-DNP se eluyeron con dinitrofenol (DNP-OH) 10⁻³M y 10⁻²M. El DNP-OH de los anticuerpos se despegó por cromatografía de intercambio iónico en Dowex 1 x 8 - 400 de Sigma (59). La actividad anti-DNP de los anticuerpos puros se probó por DID contra DNP₂₇GGB (Figura 3) y la concentración se determinó por el método de Lowry (60).

Cromatografía en capa fina de ³H-5-FU. En una placa de 10 x 10 cms de silicagel (Merck) con indicador de fluorescencia, se aplicaron aproximadamente 3 µl de una solución estándar de 5-FU 1.5 x 10⁻² y de una solución 10⁻³M de ³H-5-FU. El solvente fue n-butanol saturado con agua. La placa se reveló con luz UV y con autorradiografía observándose contaminantes. El ³H-5-FU se purificó aplicando una alícuota de aproximadamente 100 µl de la solución contaminada en forma de banda en una placa de silicagel 10 x 10 cms, se utilizó el mismo solvente y posteriormente se tomó autorradiografía de la placa. La banda correspondiente al ³H-5-FU se resus-



(a)



(b)

Figura 3. Doble inmunodifusión en agar de suero anti-DNP de borrego (a); y de anticuerpos anti-DNP puros (b). En los pozos periféricos se colocan diluciones del antígeno DNP₂₇GGB. En ambas figuras se observan bandas de precipitación en todas las diluciones del antígeno.

pendió en PBS, la droga soluble se separó del silicagel por centrifugación. La concentración de ^3H -5-FU fue determinada por absorción a 266 nm, siendo su coeficiente de extinción molar de 7070. La droga pura se comparó con la solución original. En la Figura 4 se observa la autorradiografía del cromatograma observándose una sola mancha en (b) que corresponde al ^3H -5-FU puro.

Cromatografía en capa fina de ^3H -MTX. Se usó una placa de 10 x 10 cms de silicagel (Merck) con indicador de fluorescencia. Se aplicaron aproximadamente 3 μl de una solución estandar de MTX $4.8 \times 10^{-3}\text{M}$ y de una solución de ^3H -MTX $4.9 \times 10^{-3}\text{M}$. El solvente fue carbonato de sodio al 0.5%. La placa se reveló con luz UV y autorradiografía (Figura 5). Se detectaron cantidades despreciables de contaminantes.

Cromatografía en capa fina de ^3H -CTA. Se usó una placa de 10 x 10 cms de celulosa (Merck) con indicador de fluorescencia. Se aplicaron aproximadamente 3 μl de una solución estandar de CTA $7.23 \times 10^{-3}\text{M}$, y de una solución de ^3H -CTA $7.4 \times 10^{-5}\text{M}$. El solvente fue n-butanol: etanol:agua (4:11:9). La placa se reveló con luz UV y autorradiografía. No se detectaron contaminantes (Figura 5).

2) DIALISIS EN EQUILIBRIO:

Por medio de diálisis en equilibrio (Apéndice III) se obtienen los estimados de droga libre [L] y pegada [P], necesarios para determinar la constante de asociación [K] y el número de sitios de fijación n , de las drogas citotóxicas que se fijan a las IgG y a los anticuerpos anti-DNP. Los experimentos



(a)

(b)

Figura 4. Autorradiografía de la cromatografía en capa fina de ^3H -5-FU en silicagel. (a) ^3H -5-FU contaminado; (b) ^3H -5-FU puro.

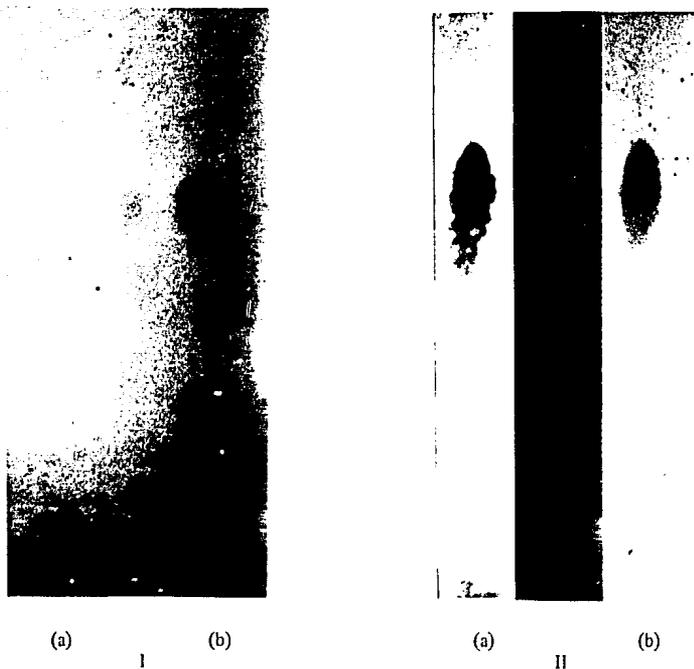


Figura 5. I. Cromatografía en capa fina de ^3H -CTA en celulosa (a); CTA estandar (b).
II. Cromatografía en capa fina de ^3H -MTX en silicagel (b); MTX estandar (a).

se realizaron en un aparato de multidiálisis, fabricado en el centro de instrumentos de la UNAM, el cual consta de 3 módulos de lucita con 8 cámaras para diálisis por módulo.

Preparación del equipo. Después de cada experimento de diálisis se dejan lavando los módulos en agua corriente durante 2 días para eliminar residuos radiactivos, lavándolos posteriormente con agua destilada y secándolos con aire.

Las membranas de diálisis se hierven 3 veces con agua destilada nueva después de cada ebullición para eliminar perfectamente la glicerina.

Se pone una membrana entre cada módulo quitándole el exceso de agua con una gasa. Por último se colocan los 3 módulos en el eje del aparato y se sujetan con una tuerca de plástico.

Colocación de las soluciones. Cada cámara de diálisis tiene un orificio de cada lado de la membrana por donde se inyectan 100 μl de cada una de las soluciones de droga citotóxica en un lado de la cámara y 100 μl de una solución de anticuerpos de concentración constante del otro lado de cada una de las 24 cámaras de diálisis; los orificios se tapan con cinta adhesiva. Cada solución de droga citotóxica se pone por duplicado. El multidiálizador se coloca en un cuarto frío a 4°C con agitación por mecanismos incorporados a cada aparato, durante 72 horas.

Toma de la muestra. Se toman 50 μl de cada lado de las 24 cámaras comenzando del lado del ligando de concentración más baja y, después, del lado de la proteína empezando con la solución que está en contacto

con la del ligando más diluida.

Cada una de las muestras se pone en un vial con 5 ml de líquido de centelleo y se cuentan en un contador de centelleo líquido.

Del lado donde no hay proteína se obtienen las cuentas por minuto CPM del ligando libre [L] y del lado donde está la proteína se obtienen las CPM del ligando pegado [P] a la proteína haciendo una resta del libre.

$$([P] + [L]) - [L] = [P]$$

Las concentraciones molares se obtienen por la siguiente relación:

$$[L] \text{ ó } [P] = \text{CPM} \times \frac{1}{60} \times \frac{1}{\text{actividad específica}} \times \frac{1}{\text{eficiencia}} \times \frac{1 \text{ litro}}{\text{volumen de la muestra}}$$

3) OTRAS PRUEBAS PARA TRATAR DE CONFIRMAR LA FIJACION DE 5-FU A ANTICUERPOS ANTI-DNP:

Se preparó una mezcla de anticuerpos anti-DNP $1.25 \times 10^{-5} \text{ M}$ con 5-FU más ^3H -5-FU a una concentración total de $1.672 \times 10^{-5} \text{ M}$; la relación de 5-FU/ ^3H -5-FU fue de 1.6. La concentración de 5-FU para estos experimentos se estimó por diálisis en equilibrio a $\text{pH}=6$, extrapolando en el eje de las abscisas del Scatchard la cantidad de 5-FU total que satura a esa concentración de anticuerpos. Se incubó la mezcla de 5-FU y anticuerpos anti-DNP durante 72 hs a 4°C y se hicieron las siguientes pruebas:

Cromatografía de exclusión. En una columna de Sephadex G-10 de $25 \times 0.5 \text{ cms}$, con un flujo de 0.9 ml/min , se filtraron $25 \mu\text{l}$ de la mezcla

de 5-FU (5-FU+³H-5-FU) y anticuerpos anti-DNP a pH=6. La columna se calibró con dextran azul al 0.5%. Se eluyó con PBS colectando fracciones de 0.12 ml, se tomaron alícuotas de 50 µl de cada fracción y se adicionaron 5 ml de líquido de centelleo, las CPM se midieron en un contador de centelleo líquido.

Fijación de anticuerpos anti-DNP a seda-DNP. Por duplicado se pusieron a incubar durante 48 hs a temperatura ambiente 5 cms de seda-DNP y seda blanca por separado, en 0.5 ml de la mezcla de 5-FU (5-FU+³H-5-FU) y anticuerpos anti-DNP, y en 0.5 ml de 5-FU solo (5-FU+³H-5-FU). Se estimó la radiactividad asociada a los hilos sin lavar y lavándolos con PBS después de la incubación, cada hilo se puso en 0.4 ml de NCS (solubilizador de tejidos de Amersham Searle) durante 18 hs y se le agregaron 10 ml de líquido de centelleo, las CPM se registraron en el contador de centelleo líquido.

Doble inmunodifusión de anticuerpos anti-DNP y autorradiografía. En geles de agar al 1% en PBS se hizo DID por duplicado, de la mezcla 5-FU (5-FU+³H-5-FU) y anticuerpos anti-DNP de borrego en contra de γ de cerdo anti-suero de borrego, una placa se lavó y la otra no. Posteriormente ambas se sometieron a autorradiografía a diferentes tiempos de exposición, en películas Kodak X-Omat-RP.

II. FIJACION DE 5-FU, MTX Y CTA A ANTICUERPOS ANTI-DNP DESNATURALIZADOS REVERSIBLEMENTE.

Esta parte del trabajo se llevó a cabo desnaturizando anticuerpos anti-DNP por medio de clorhidrato de guanidina (GuHCl), y de calor.

La formación de conjugados droga-anticuerpo tipo complejos de inclusión se buscó renaturalizando los anticuerpos anti-DNP en presencia de cada una de las drogas citotóxicas tritadas (^3H -5-FU, ^3H -MTX, ^3H -CTA).

1) DESNATURALIZACION Y RENATURALIZACION DE ANTICUERPOS ANTI-DNP CON GuHCl.

0.5 mg/ml de anticuerpos anti-DNP fueron incubados durante 2 hs en diferentes concentraciones de GuHCl en PBS (1 a 8 M), cada solución fue diluida 10 veces por diálisis en PBS durante 24 hs a 4°C. El cambio conformacional de los anticuerpos por la desnaturización fue seguido por rotación óptica a 365 nm en un polarímetro Perkin Elmer.

2) DESNATURALIZACION REVERSIBLE DE ANTICUERPOS ANTI-DNP CON CALOR.

1.0 mg/ml de anticuerpos anti-DNP fueron calentados desde 20°C a 50°C y luego enfriados hasta 20°C otra vez. Se midió su rotación específica a intervalos de 5°, esperando 5 minutos a que se estabilizara la proteína a cada temperatura. Su capacidad para reconocer al antígeno se probó por DID antes y después del calentamiento.

3) DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD Y DE LA CONCENTRACION MOLAR TOTAL DE SITIOS ACTIVOS DE ANTICUERPOS ANTI-DNP RENATURALIZADOS.

1 mg/ml de anticuerpos anti-DNP fueron incubados durante dos horas a

temperatura ambiente en GuHCl 5M; posteriormente se diluyeron diez veces por diálisis en PBS. Su actividad inmunológica fue probada por DID en agarosa al 1% contra el conjugado DNP₂₇GGB. Se hizo diálisis en equilibrio de los anticuerpos renaturalizados y de los nativos, la concentración utilizada fue 1.562×10^{-6} M. El rango de concentración del hapteno ³H-DNP-lisina fue de 6.5×10^{-5} a 5.9×10^{-8} M en PBS.

4) FORMACION DE CONJUGADOS POR DESNATURALIZACION REVERSIBLE DE ANTICUERPOS ANTI-DNP EN PRESENCIA DE LAS DROGAS CITOTOXICAS.

a) Se incubaron 4.12 mg/ml de anticuerpos anti-DNP en GuHCl 5M en PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente el GuHCl fue diluido diez veces por diálisis en soluciones de cada una de las tres drogas tritadas en PBS; ³H-5-FU 1.66×10^{-4} M, con actividad específica de 3 Ci/mmol, ³H-MTX 3.85×10^{-5} M con actividad específica de 12.8 Ci/mmol y ³H-CTA 1.92×10^{-5} M con actividad específica de 26 Ci/mmol.

b) Se incubaron 2.06 mg/ml de anticuerpos anti-DNP a 45°C durante 10 minutos con cada una de las tres drogas citotóxicas tritadas; ³H-5-FU 1.55×10^{-4} M y actividad específica de 3 Ci/mmol; ³H-MTX 2.0×10^{-3} M y actividad específica de 250 mCi/mmol y ³H-CTA 3.7×10^{-5} M con actividad específica de 13.2 Ci/mmol. Inmediatamente después de la incubación la mezcla droga citotóxica y anticuerpos se enfrió en hielo.

5) PRUEBAS PARA DETECTAR LA FORMACION DE CONJUGADOS DROGA-ANTICUERPOS ANTI-DNP DESNATURALIZADOS REVERSIBLEMENTE.

- a) Cromatografía de exclusión.- En una columna de Sephadex G-10 de 25 x 0.5 cms se filtraron 25 μ l de cada una de las mezclas de 3 H-5-FU, 3 H-MTX y 3 H-CTA con los anticuerpos anti-DNP desnaturalizados reversiblemente con GuHCl y con calor. La columna se calibró con dextran azul al 0.5 $^{\circ}$ /. El flujo fue de 0.9 ml/min y se colectaron fracciones de 0.12 ml, las CPM se estimaron en alícuotas de 50 μ l de cada fracción, mezclándolas con 5 ml de líquido de centelleo, en un contador de centelleo líquido.
- b) Doble inmunodifusión y fluorografía.- En geles de agarosa al 1 $^{\circ}$ /% en PBS se hizo DID por duplicado de cada una de las mezclas de 3 H-5-FU, 3 H-MTX y 3 H-CTA con los anticuerpos anti-DNP desnaturalizados reversiblemente con GuHCl y con calor. Los anticuerpos se precipitaron con suero de conejo anti-Igs de borrego, una placa se lavó y la otra no. Se trataron ambas placas para fluorografía (61), con 20 volúmenes de metanol durante 30 minutos dos veces, y por último 3 hs en 4 volúmenes de PPO (2,5-diphenyloxazol) al 10 $^{\circ}$ /% en metanol; luego se secaron al vacío y se expusieron en películas X-Omat RP Kodak, sensibilizadas, durante 72 hs a -70 $^{\circ}$ C.

RESULTADOS

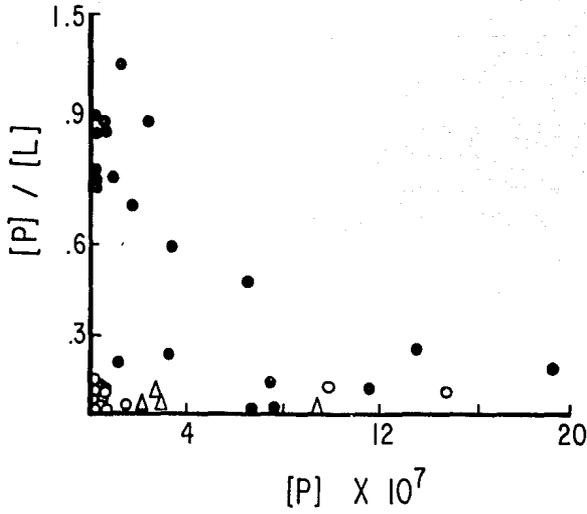
I) FIJACION DE 5-FU, MTX Y CTA A IgG BOVINA

En las Figuras 6 y 7 se observan las gráficas de Scatchard correspondientes a las diálisis en equilibrio de 5-FU, MTX y CTA con IgG bovina pH=7.2. De inmediato se aprecia que solo hay formación de conjugados entre 5-FU e IgG bovina por la pendiente negativa en la curva de fijación para esta droga. En los trazos de Scatchard para 5-FU se observa la curvilinearidad del fenómeno de fijación, apreciándose una tendencia general de los puntos hacia una curva bifásica con pendientes negativas que corresponden a dos tipos de sitios de fijación con diferente afinidad.

El valor aproximado de $[So]$ -concentración molar total de sitios de fijación- se estimó en el intercepto con el eje de $[P]$ para cada conjunto de sitios. Dividiendo cada uno de éstos $[So]$ entre la cantidad total de proteína se estimó n , el número total de moléculas de 5-FU capaces de unirse con esa afinidad a cada molécula de IgG. Haciendo una gráfica de la proporción de sitios ocupados en cada rango de afinidad (r) contra el logaritmo de la concentración de 5-FU libre (figura 8), se pudo calcular en base a una regresión lineal por mínimos cuadrados la concentración de ligando libre a la cual se satura el 50% ($[L]_{r=,5}$) de cada tipo de sitios con distintos grados de certidumbre dependiendo de la variación experimental. Para estimar las constantes de afinidad promedio, se ajustaron los datos obtenidos por el análisis de Scatchard a la ecuación de Sips, según se

ilustra gráficamente en la parte inferior de las Figuras 6 y 7. Las regresiones lineares por mínimos cuadrados estimaron constantes de afinidad del orden de 10^6 M^{-1} , para sitios de alta afinidad y de 10^4 y 10^2 M^{-1} para sitios de baja afinidad. Todos estos datos se resumen en la Tabla II. En esta tabla hay que notar que sólo dos o tres moléculas de 5-FU se asocian con alta afinidad por cada cien moléculas de IgG. En cambio, en el rango de baja afinidad, hay dos o tres asociaciones de 5-FU por cada diez Igs. También en la Tabla II se consigna la concentración de 5-FU libre necesaria para obtener estos conjugados al 50% de saturación, la que resultó ser del orden de 10^{-4} mg/ml tanto para los de alta afinidad como para los de baja afinidad (Figura 8). En un conjugado de baja afinidad no fue posible evaluar $[L]_{r=.5}$ debido a la gran dispersión de los datos.

SCATCHARD



SIPS

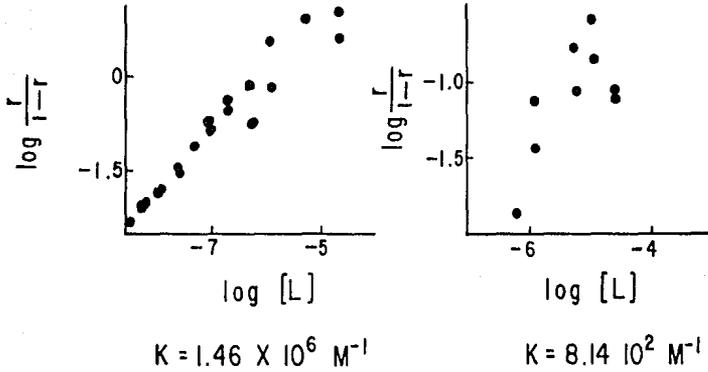


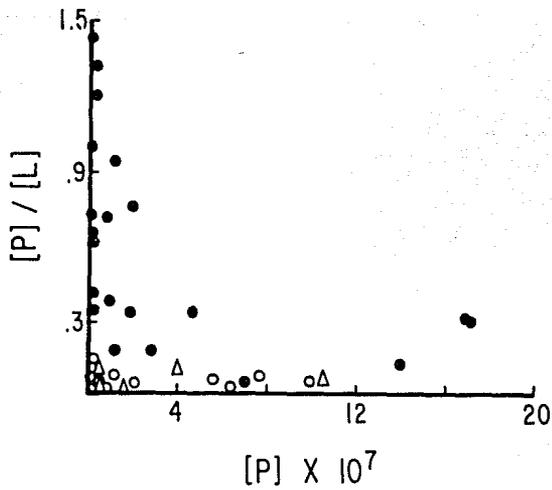
Figura 6. Fijación de 5-FU(●), MTX(○) y CTA (Δ) a IgG bovina a pH=7.2.

TABLA II
CONJUGADOS 5-FU-IgG

| | n | [So] M | K M ⁻¹ | [L] _{r=.5} mg/ml |
|------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| Alta Afinidad | 3.16 x 10 ⁻² | 8.49 x 10 ⁻⁷ | 1.46 x 10 ⁶ | 2.31 x 10 ⁻⁴ |
| | 1.99 x 10 ⁻² | 5.35 x 10 ⁻⁷ | 1.24 x 10 ⁶ | 1.13 x 10 ⁻⁴ |
| Baja Afinidad | 3.38 x 10 ⁻¹ | 9.09 x 10 ⁻⁶ | 8.14 x 10 ² | ND |
| | 2.96 x 10 ⁻¹ | 7.96 x 10 ⁻⁶ | 1.66 x 10 ⁴ | 1.30 x 10 ⁻⁴ |

- n = Número de sitios de fijación por molécula de IgG.
 [So] = Concentración molar total de sitios de fijación.
 K = Constante de asociación promedio.
 [L] = Concentración de 5-FU libre en cada tipo de conjugado.
 r = Concentración de 5-FU pegado / [So] .
 ND = No se determinó por variación experimental incontrolable.

SCATCHARD



SIPS

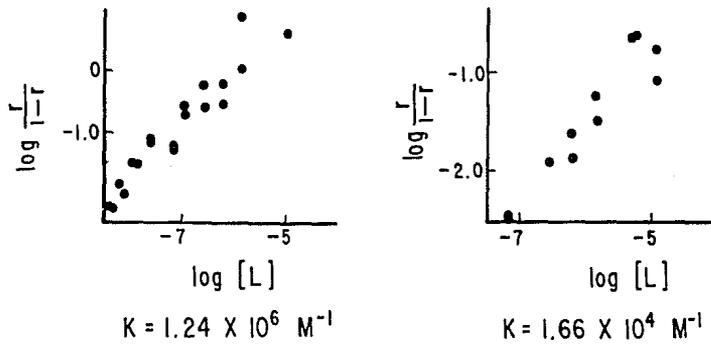


Figura 7. Otra ilustración de la fijación de 5-FU(o), MTX(o) y CTA(Δ) a IgG bovina a pH=7.2

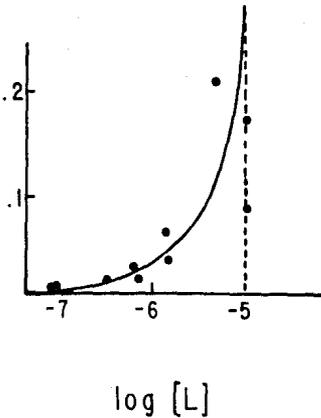
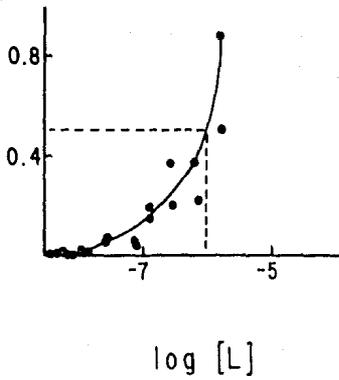
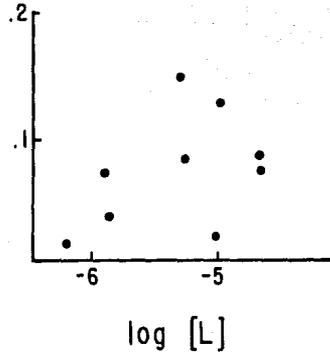
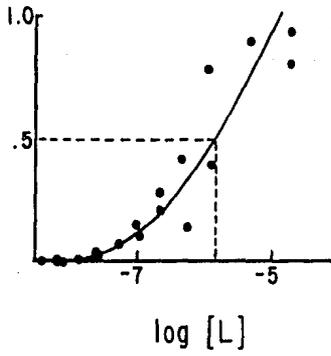


Figura 8. Gráficas para la evaluación de la cantidad de 5-FU libre necesario para obtener algún conjugado 5-FU-IgG al 50% de saturación.

II) FIJACION DE 5-FU A ANTICUERPOS ANTI-DNP

En la Figura 9 se presentan los trazos de Scatchard de las diálisis en equilibrio entre 5-FU y anticuerpos anti-DNP a $\text{pH}=7.2$. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de anticuerpos, $1.45 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $4.12 \times 10^{-5} \text{ M}$, y en ningún caso se encontró asociación de 5-FU pues, además de la variación experimental, las pendientes nunca fueron menores de cero.

SCATCHARD

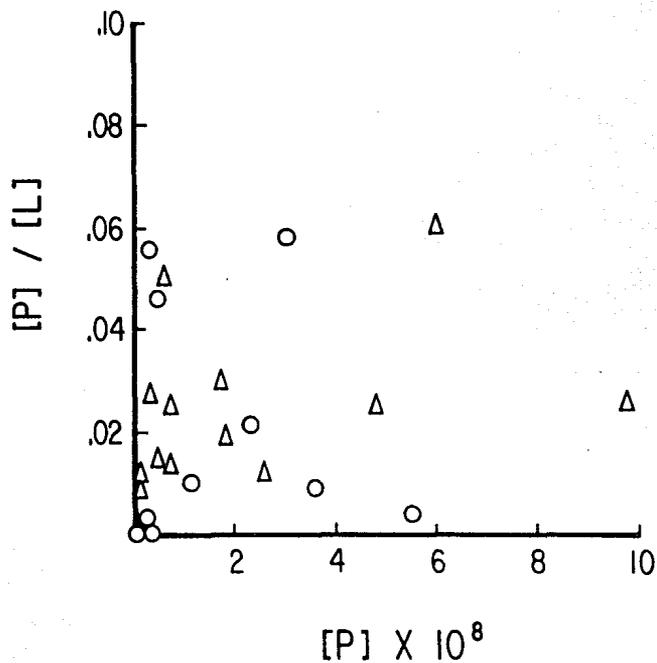


Figura 9. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP a pH=7.2. Anticuerpos anti-DNP a $1.45 \times 10^{-5} \text{ M}$ (Δ) y a $4.12 \times 10^{-5} \text{ M}$ (o).

III) EFECTO DEL pH EN LA FIJACION DE 5-FU, MTX Y CTA A ANTICUERPOS ANTI-DNP

En la Tabla III se resumen los experimentos de diálisis en equilibrio que se llevaron a cabo con anticuerpos antiDNP y las tres drogas citotóxicas a pH=5, 6, 7.2, 8 y 9. Sólo hubo formación de conjugados entre droga y anticuerpos con 5-FU, a pH=6 y con MTX a pH=6 y pH=7.2

Los trazos de Scatchard de tres experimentos de fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP pH=6 se ilustran en las Figuras 10, 11 y 12. En ellos debe notarse la dispersión de los puntos que impide reconocer con certidumbre la existencia de curvilinearidad, dando la impresión de que se trata de un solo tipo de sitios de fijación para la droga. Como se muestra en las curvas de fijación, la asociación de 5-FU a los anticuerpos anti-DNP no es perfectamente reproducible, presentando variación de los resultados de n , $[So]$ y K , ilustrados en la Tabla IV. Para disminuir la variación proveniente de la existencia de contaminantes en la solución de 3H -5-FU, ésta se purificó por cromatografía en capa fina (Figura 4). Se repitieron los experimentos de diálisis en equilibrio con la droga pura y no se encontraron diferencias notables, la variación persistió. En las Figuras 13 y 14 se presentan las curvas de fijación utilizando 5-FU puro. Los valores de n $[So]$ y K se ilustran en la Tabla IV.

Los conjugados formados con 5-FU y anticuerpos anti-DNP a pH=6 requieren de 10 a 1000 moléculas de anticuerpo para fijar de 1 a 4 de 5-FU con afinidades de 10^5 a 10^6 M^{-1} . La cantidad de 5-FU libre para

| pH | DROGA EMPLEADA | | |
|-----|----------------|-----|-----|
| | 5-FU | MTX | GTA |
| 5 | NO | NO | NO |
| 6 | SI | SI | NO |
| 7.2 | NO | SI | NO |
| 8 | NO | NO | NO |
| 9 | NO | NO | NO |

Tabla III. Fijación de distintas drogas a anticuerpos anti-DNP. El criterio de fijación consiste en la magnitud de la pendiente (m) del trazo de Scatchard (SI, cuando $m < 0$ y NO, cuando $m \geq 0$).

SCATCHARD

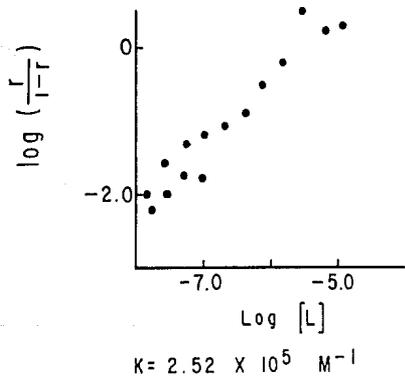
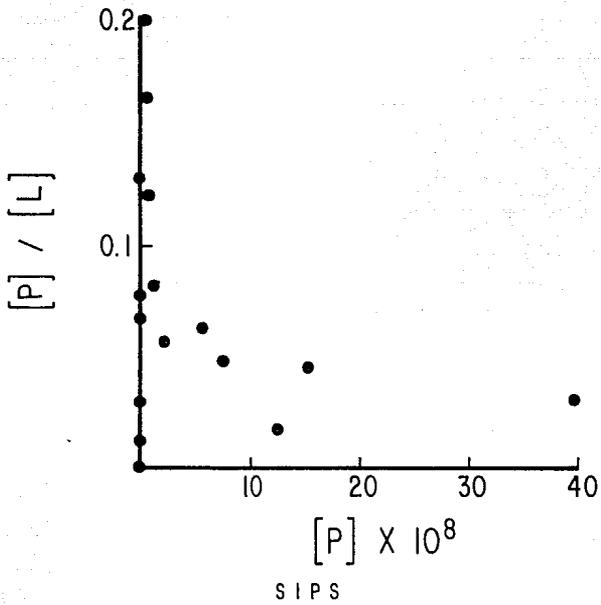
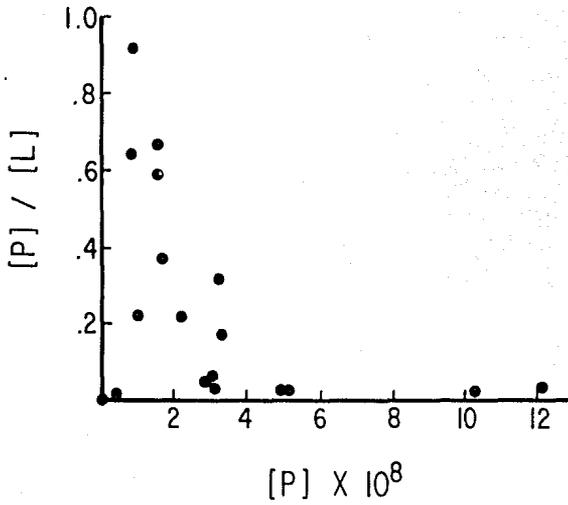


Figura 10. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP a pH=6.

SCATCHARD



SIPS

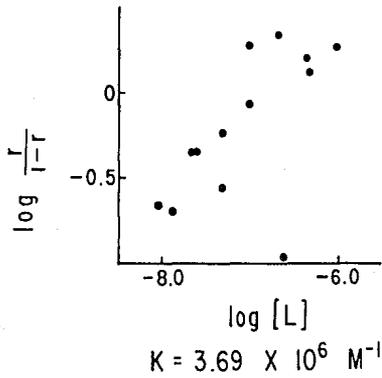
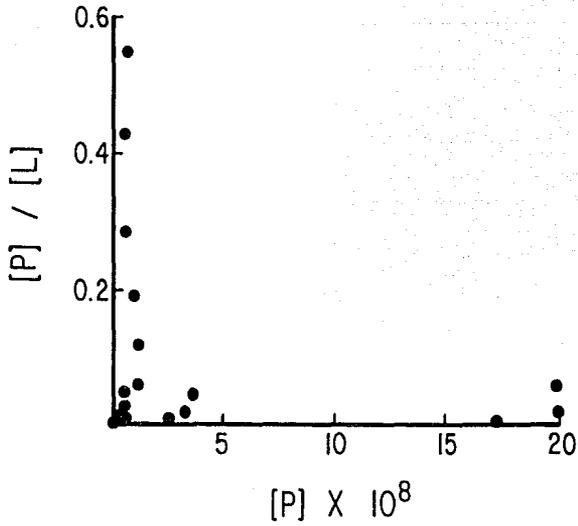


Figura 11. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP a pH=6.

SCATCHARD



SIPS

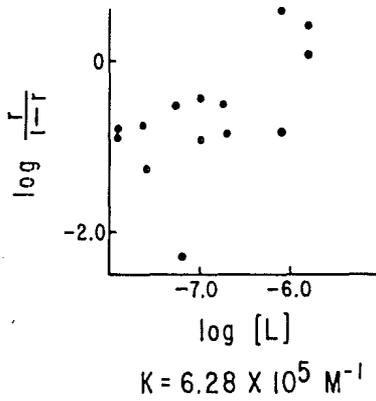


Figura 12. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP a pH=6.

TABLA IV
 CONJUGADOS 5-FU-Ac ANTI-DNP A pH=6

| n | [So] M | K M ⁻¹ | [L] _{r=.5} mg/ml |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| 2.10 x 10 ⁻¹ | 2.66 x 10 ⁻⁷ | 4.20 x 10 ⁵ | 6.36 x 10 ⁻⁴ |
| 1.60 x 10 ⁻¹ | 2.03 x 10 ⁻⁷ | 2.52 x 10 ⁵ | 3.58 x 10 ⁻⁴ |
| 4.00 x 10 ⁻² | 4.90 x 10 ⁻⁸ | 3.69 x 10 ⁶ | ND |
| 1.10 x 10 ⁻² | 1.42 x 10 ⁻⁷ | 2.06 x 10 ⁶ | 9.63 x 10 ⁻⁵ |
| 3.70 x 10 ⁻³ | 4.60 x 10 ⁻⁸ | 6.28 x 10 ⁵ | 9.86 x 10 ⁻⁵ |

- n = Número de sitios de fijación por molécula de anticuerpo.
 [So] = Concentración molar total de sitios de fijación.
 K = Constante de asociación promedio.
 [L] = Concentración de 5-FU libre en cada tipo de conjugado.
 r = Concentración de 5-FU pegado / [So] .
 ND = No se determinó por variación experimental incontrolable.

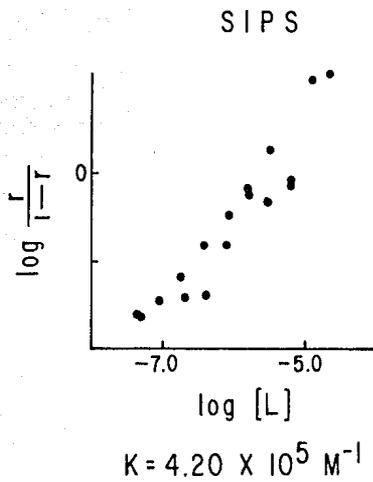
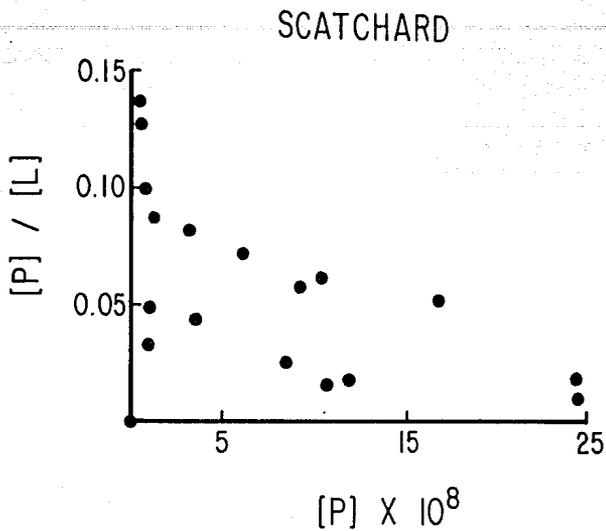


Figura 13. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP a pH=6.

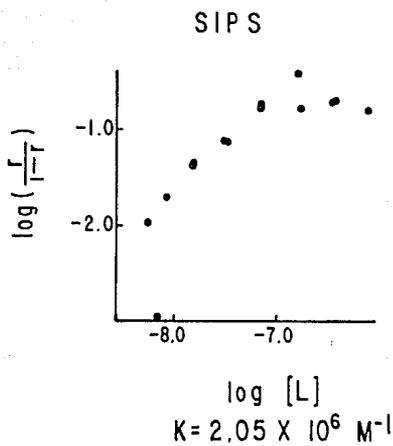
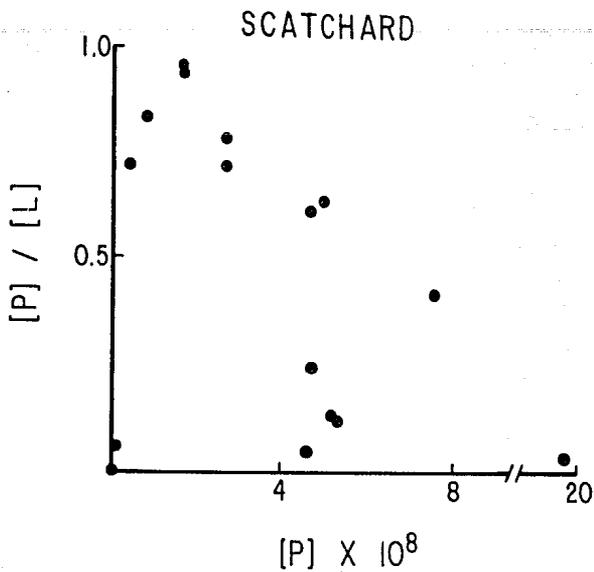


Figura 14. Fijación de 5-FU a anticuerpos anti-DNP a pH=6. El 5-FU fue purificado por cromatografía en capa fina.

que existan estos conjugados al 50% de saturación resultó ser aproximadamente de 10^{-4} a 10^{-5} mg/ml (Figura 15).

Para demostrar la existencia de los conjugados 5-FU-anticuerpos anti-DNP A pH=6 por otros métodos se hicieron las siguientes pruebas:

a) Cromatografía de exclusión en Sephadex G-10 de la mezcla ^3H -5-FU y anticuerpos anti-DNP a pH=6, esperando separar los conjugados en el volumen de exclusión del gel. En la Figura 16 se observa el patrón de elución de la mezcla y de ^3H -5-FU solo, el que muestra un pico que podría corresponder a una pequeña cantidad de conjugado, aunque éste no se presentó en todos los casos. También se identifica un desplazamiento del pico de la droga mezclada con los anticuerpos respecto a la droga sola. Esto sugiere la disociación de los conjugados entre 5-FU y anticuerpos anti-DNP.

b) Fijación de anticuerpos anti-DNP a seda-DNP (seda dinitrofenilada). En caso de que el ^3H -5-FU se asociara a los anticuerpos anti-DNP, la seda se volvería radiactiva. En la Tabla V se describe la fijación a seda-DNP y a seda blanca de anticuerpos anti-DNP mezclados con ^3H -5-FU, así como la de ^3H -5-FU sólo en base a las CPM de la seda sin lavar y lavada. En la tabla V puede notarse que si bien había una pequeña diferencia de radiactividad entre la seda-DNP y la seda blanca, al lavar ambas y estimar después las CPM la diferencia desapareció. Esto también hace pensar en la disociación de la droga.

c) Precipitación en agar de anticuerpos anti-DNP mezclados con ^3H -5-FU,

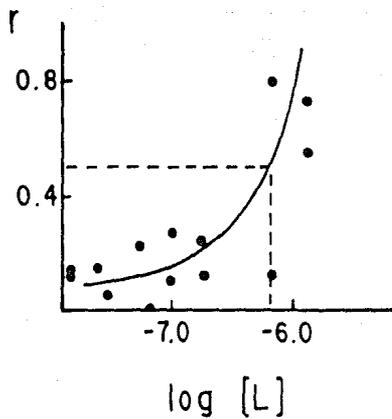
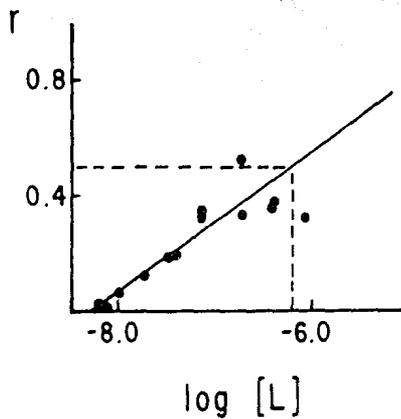
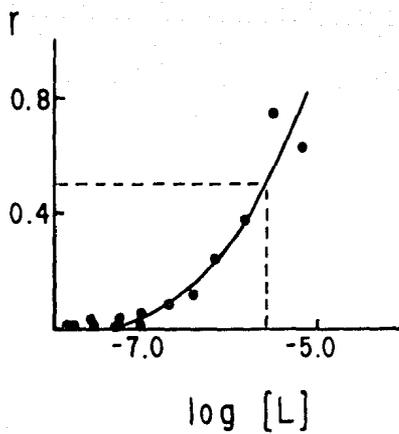
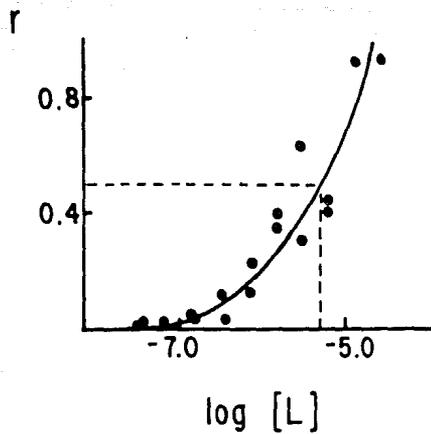


Figura 15. Gráficas para la evaluación de la cantidad de 5-FU libre necesario para obtener algún conjugado 5-FU-anticuerpos anti-DNP al 50% de saturación.

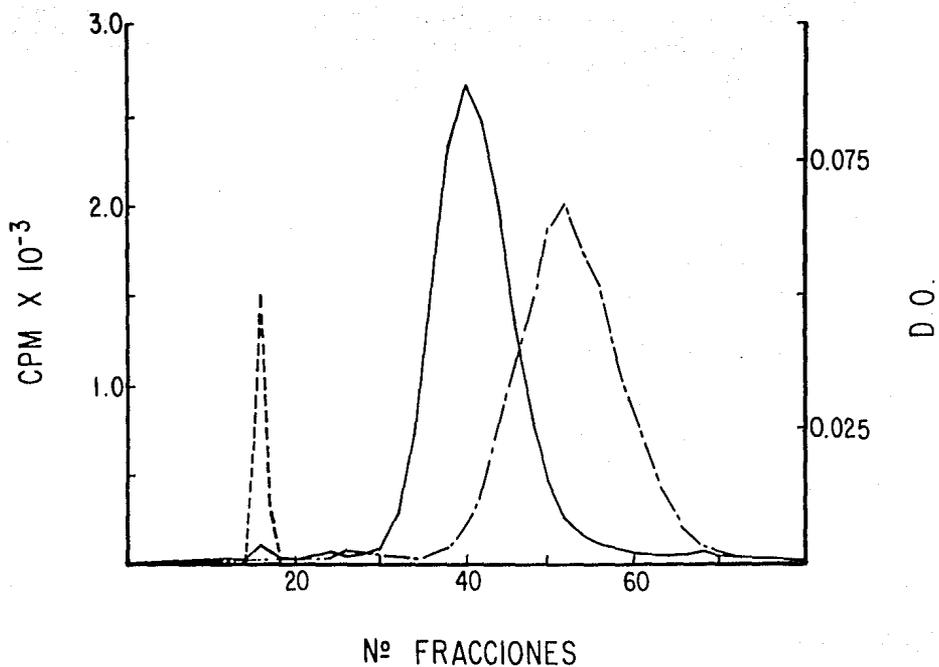


Figura 16. Patrón de elución en Sephadex G-10 de dextrán azul (- - -). ³H-5-FU mezclado con anticuerpos anti-DNP (—) y ³H-5-FU solo (— · —) pH=6.

| | SEDA-DNP | | SEDA BIANCA | |
|---------------------|-----------|--------|-------------|--------|
| | SIN LAVAR | LAVADA | SIN LAVAR | LAVADA |
| Ac ANTI-DNP + | 432 | 79 | 105 | 92 |
| ³ H-5-FU | 315 | 109 | 132 | 77 |
| ³ H-5-FU | 338 | 101 | 133 | 78 |
| | 205 | 107 | 295 | 108 |

Tabla V. Fijación a seda-DNP de anticuerpos anti-DNP mezclados con ³H-5-FU a pH=6.

utilizando un segundo anticuerpo. La precipitación se llevó a cabo por duplicado, una placa se lavó y la otra no. Se esperaba encontrar radiactividad en caso de que ^3H -5-FU se hubiera pegado a los Ac. anti-DNP. Se hizo autorradiografía de las bandas de precipitación en el gel de inmunodifusión y no se encontró radiactividad en ningún caso, ni aún en la placa de DID sin lavar, donde se esperaba encontrar un fondo de radiactividad por el ^3H -5-FU libre.

En las Figuras 17 y 19 se muestran las curvas de fijación de MTX a anticuerpos anti-DNP a pH=6 y 7.2. Es evidente que a pH=6 existen dos tipos de sitios de fijación para la droga, unos de alta y otros de baja afinidad, mientras que a pH=7.2 sólo encontramos los de baja afinidad. Los valores de $[\text{So}]$ y K para cada tipo de conjugados se reportan en la Tabla VI. Los conjugados que se forman con MTX y anticuerpos anti-DNP, contienen un mayor número de moléculas de droga asociadas a cada molécula de anticuerpo, aunque con afinidades inferiores a las encontradas con 5-FU: se pegan de 2 a 5 moléculas de MTX por molécula de anticuerpo con afinidades del orden de 10^2 a 10^4 M^{-1} (Figuras 18 y 20). Sin embargo, la cantidad de droga libre necesaria para obtener los conjugados al 50% de saturación varía entre .018 mg/ml y 1.14 mg/ml. En un conjugado de alta afinidad no fue posible evaluar los parámetros K ni $[\text{L}]_{r=.5}$ debido a la gran dispersión de los datos (Figura 21).

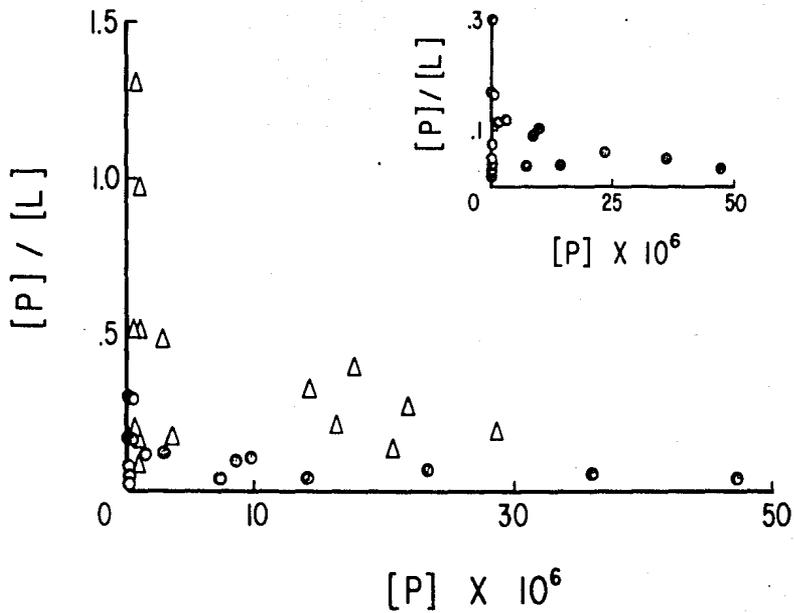
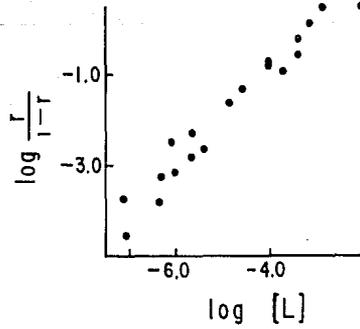


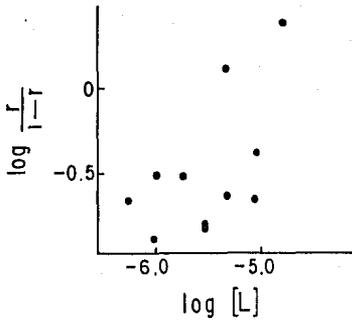
Figura 17. Fijación de MTX a anticuerpos anti-DNP a pH=6 (Δ) y a pH=7.2 (\bullet).

SIPS

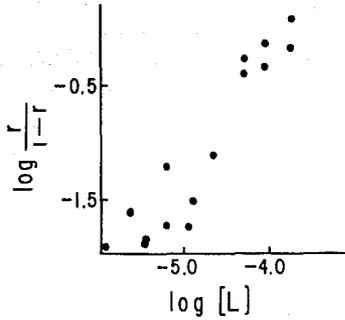


$$K = 1.48 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

(a)



$$K = 2.79 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$



$$K = 6.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

(b)

Figura 18. Trazo de Sips para determinar la constante de afinidad entre MTX y anticuerpos anti-DNP a pH=7.2 (a) y a pH=6 (b).

SCATCHARD

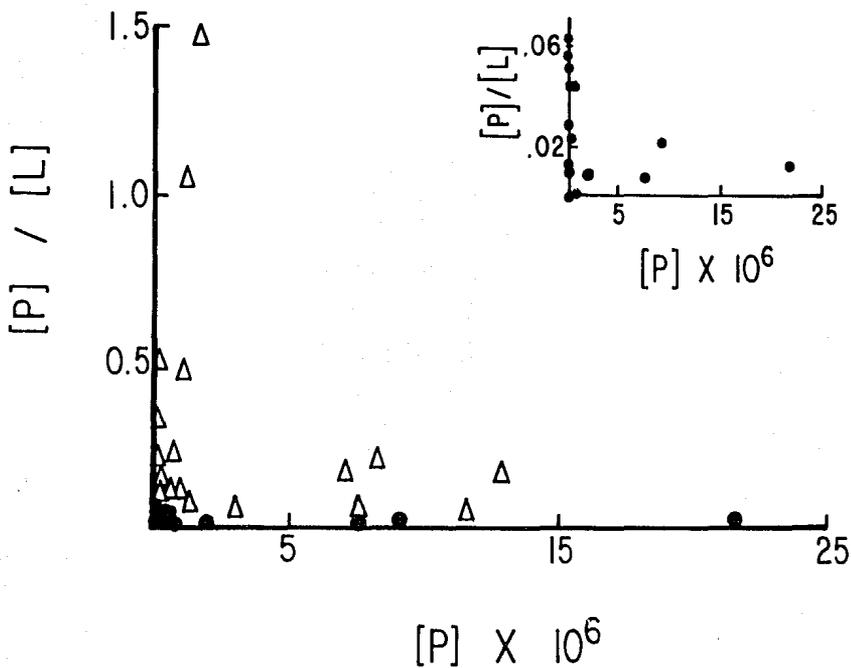
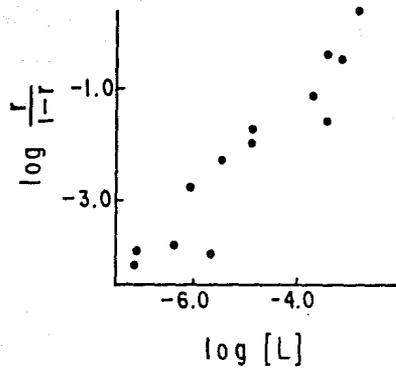


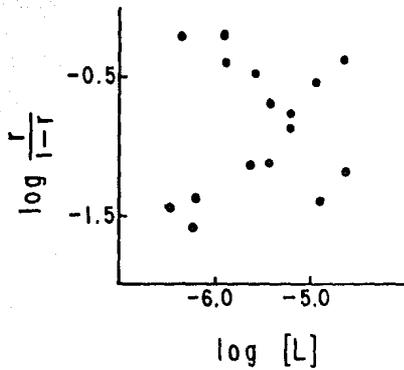
Figura 19. Otra ilustración de la fijación de MTX a anticuerpos anti-DNP a pH=6 (Δ) y a pH=7.2 (\bullet).

SIPS

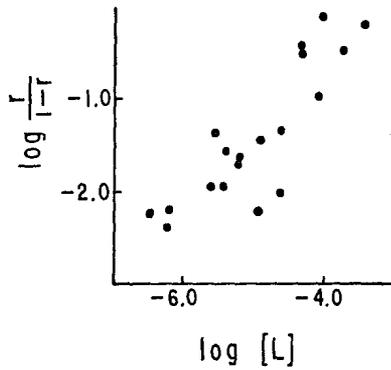


$$K = 4.46 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$$

(a)



K = ND



$$K = 1.55 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

(b)

Figura 20. Trazo de Sips para determinar la constante de afinidad entre MTX y anticuerpos anti-DNP a pH=7.2 (a) y a pH=6 (b). ND no se determinó por variación experimental incontrolable.

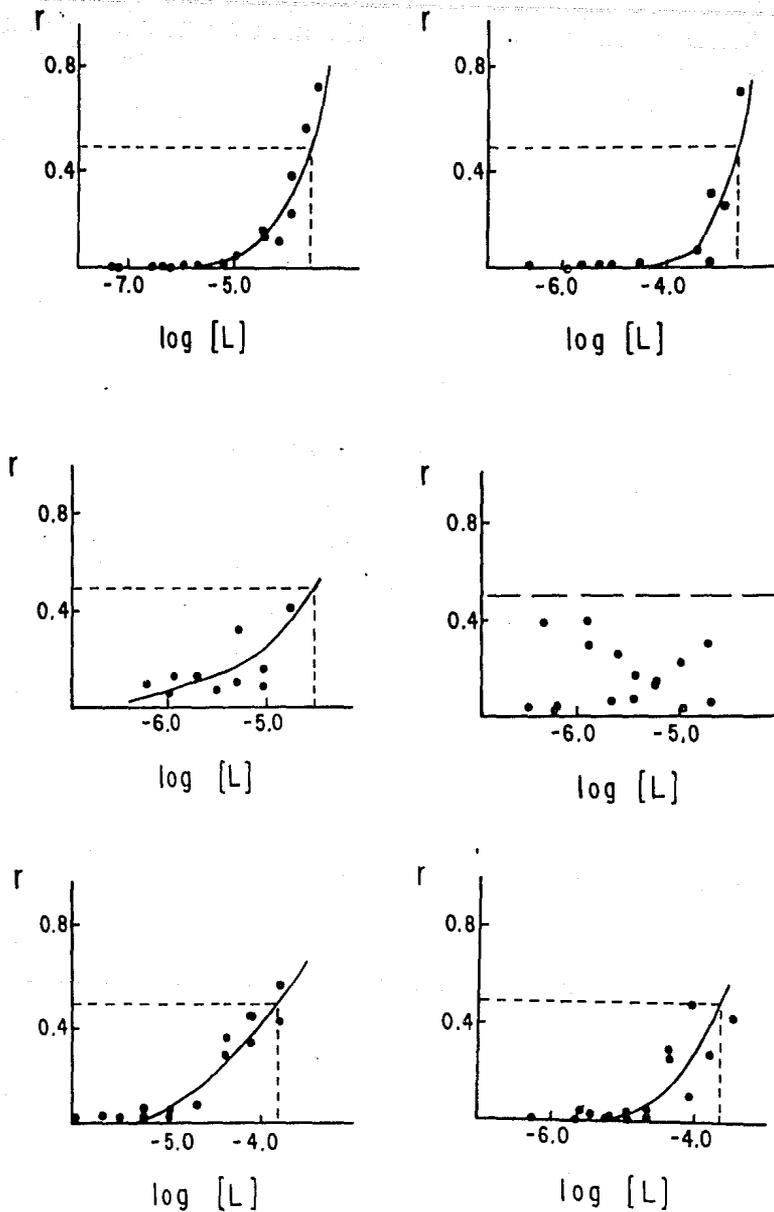


Figura 21. Gráficas para evaluar la cantidad de MTX libre necesaria para obtener algún conjugado MTX-anticuerpos anti-DNP al 50% de saturación.

TABLE VI
 CONJUGADOS MTX-Ac ANTI-DNP

| pH | n | [So] M | K M ⁻¹ | [L] _{r=.5} mg/ml | |
|------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------|
| Alta Afinidad | 0.7 | 8.90 x 10 ⁻⁶ | 2.79 x 10 ⁴ | 0.018 | |
| | 0.3 | 4.50 x 10 ⁻⁶ | ND | ND | |
| 6 | Baja Afinidad | 4.0 | 5.00 x 10 ⁻⁵ | 6.08 x 10 ³ | 0.072 |
| | | 2.1 | 2.70 x 10 ⁻⁵ | 1.55 x 10 ³ | 0.109 |
| 7.2 | | 5.0 | 6.31 x 10 ⁻⁵ | 1.48 x 10 ³ | 0.405 |
| | | 2.4 | 3.04 x 10 ⁻⁵ | 4.46 x 10 ² | 1.141 |

- n = Número de sitios de fijación por molécula de anticuerpo.
 [So] = Concentración molar total de sitios de fijación.
 K = Constante de asociación promedio.
 [L] = Concentración de MTX libre en cada tipo de conjugado.
 r = Concentración de MTX pegado / [So] .
 ND = No se determinó por variación experimental incontrolable.

IV) EFECTO DE LA DESNATURALIZACION REVERSIBLE DE ANTICUERPOS EN LA FIJACION DE 5-FU, MTX Y CTA A ANTICUERPOS ANTI-DNP

1) *Desnaturalización reversible de anticuerpos anti-DNP con Clorhidrato de guanidina.* En la Figura 22 se muestran dos curvas: una corresponde a la desnaturalización de anticuerpos anti-DNP con cantidades crecientes de GuHCl y la otra representa la renaturalización de esos anticuerpos a cada concentración de guanidina diluyendo diez veces por diálisis en PBS. La ausencia de cambios en la rotación específica a concentraciones mayores de GuHCl 5M, indica que en esta concentración se obtiene máximo desdoblamiento de los anticuerpos. En la Figura 22 también se puede apreciar que los anticuerpos recuperan su conformación nativa después de diluir diez veces el GuHCl, así como su capacidad para reconocer al antígeno por DID (Figura 23). Por diálisis en equilibrio se cuantificó la proporción de sitios activos recuperados: en la Figura 24 se muestra la curva de Scatchard de la fijación de DNP-lisina a los anticuerpos anti-DNP nativos y renaturalizados. El valor de $[So]$ fue de $12.213 \times 10^{-7} M$ y $6.220 \times 10^{-7} M$, respectivamente. La constante de afinidad se estimó por medio de la ecuación de Sips (Figura 24) y los valores obtenidos fueron de $1.548 \times 10^6 M^{-1}$ para anticuerpos nativos y $1.501 \times 10^6 M^{-1}$ para anticuerpos renaturalizados. De aquí se concluye que no hubo cambios en la constante de afinidad por la desnaturalización, pero sólo se recuperó el 50% de la capacidad

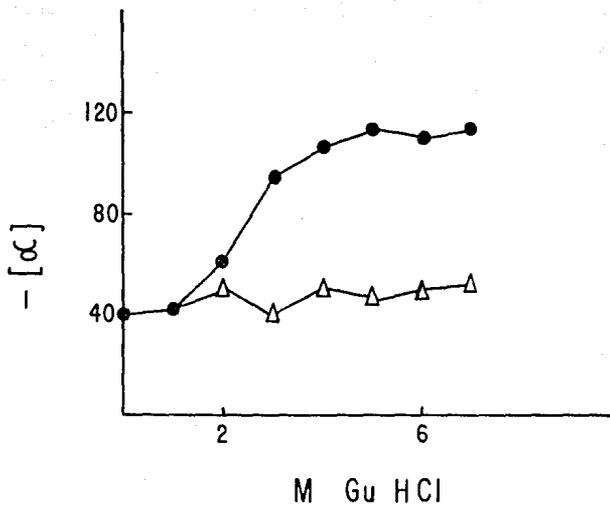


Figura 22. Desnaturalización reversible de anticuerpos anti-DNP con GuHCl. Anticuerpos desnaturalizados (●), anticuerpos renaturalizados (△).

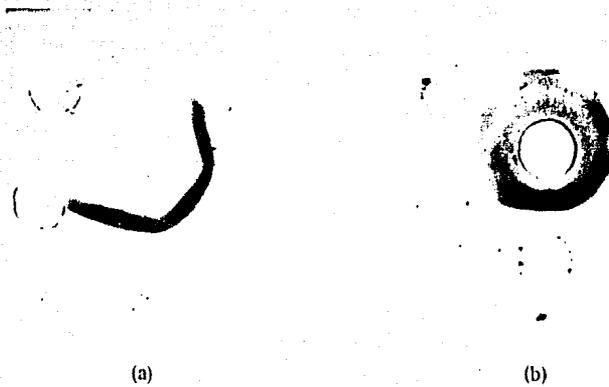
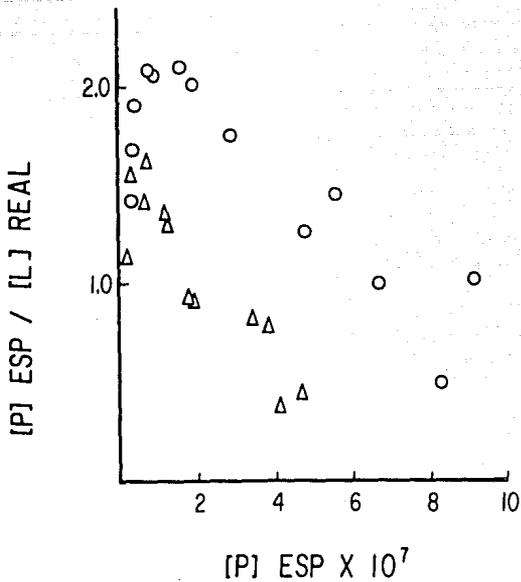


Figura 23. Precipitación en agar de DNP₂₇GGB por anticuerpos anti-DNP nativos (a) y anticuerpos anti-DNP desnaturalizados con GuHCl 5M y renaturalizados por dilución 1:10 de la guanidina (b). Pozo central-anticuerpos anti-DNP, pozos periféricos-diluciones de DNP₂₇GGB.

SCATCHARD



SIPS

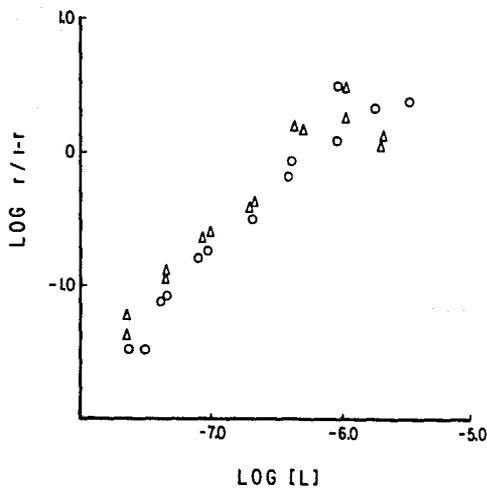


Figura 24. Fijación de DNP-lisina a anticuerpos anti-DNP desnaturalizados con GuHCl 5M. Anticuerpos nativos (o), anticuerpos renaturalizados (Δ).

para unirse al hapteno.

2) *Desnaturalización reversible de anticuerpos anti-DNP con calor.* Los anticuerpos anti-DNP solo registraron un pequeño cambio en su rotación específica con el aumento de la temperatura (Figura 25) pero no perdieron su actividad específica según fue medida por la capacidad de fijar al antígeno en DID después de ser enfriados (Figura 26).

3) *Acoplamiento de 5-FU, MTX y CTA a anticuerpos anti-DNP desnaturalizados con GuHCl 5M y con calor.* El acoplamiento de 5-FU, MTX y CTA con anticuerpos anti-DNP desnaturalizados reversiblemente, se buscó renaturalizando a los anticuerpos en presencia de cada una de las drogas citotóxicas tritadas. La cantidad de droga asociada se evaluó filtrando una pequeña alícuota de la mezcla en Sephadex G-10 para separar la droga conjugada de la libre. En las Figuras 27, 28 y 29 se presentan los patrones de elución de cada una de estas mezclas, tanto con anticuerpos desnaturalizados con GuHCl 5M como con calor a 45°C. En ningún caso se pudo ver algún pico en el volumen de exclusión que correspondiera a los conjugados droga-proteína. MTX y CTA ambas son excluidas del gel aún cuando se pasen solas. Otra alícuota de las mezclas se sometió a DID contra suero anti-IgG de borrego. Los conjugados droga-anticuerpo se buscaron por fluorografía de las bandas de precipitación en el gel de inmunodifusión. Por este método sólo se pudo detectar formación de conjugados entre CTA y anticuerpos anti-DNP desnaturalizados con calor (Figura 30).

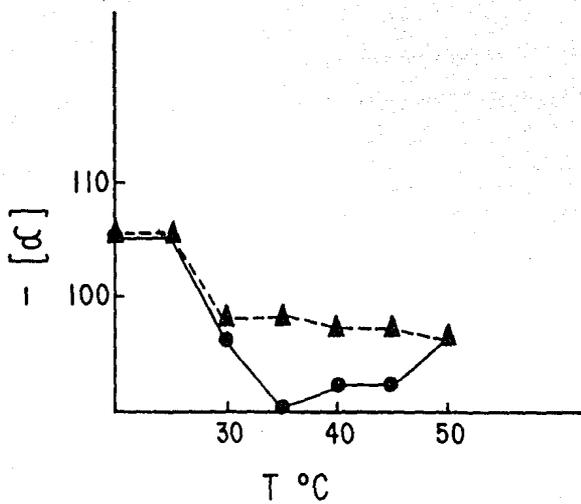


Figura 25. Desnaturalización reversible de anticuerpos anti-DNP con calor. Anticuerpos desnaturalizados (●), anticuerpos renaturalizados (▲).

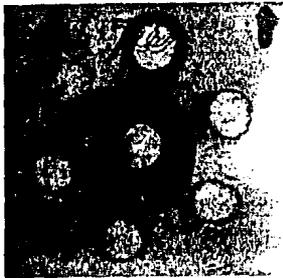


Figura 26. Doble inmunodifusión en agar de anticuerpos anti-DNP calentados a 50°C y enfiados hasta 20°C. En el pozo central están los anticuerpos y en los pozos periféricos diluciones del antígeno DNP₂₇GGB.

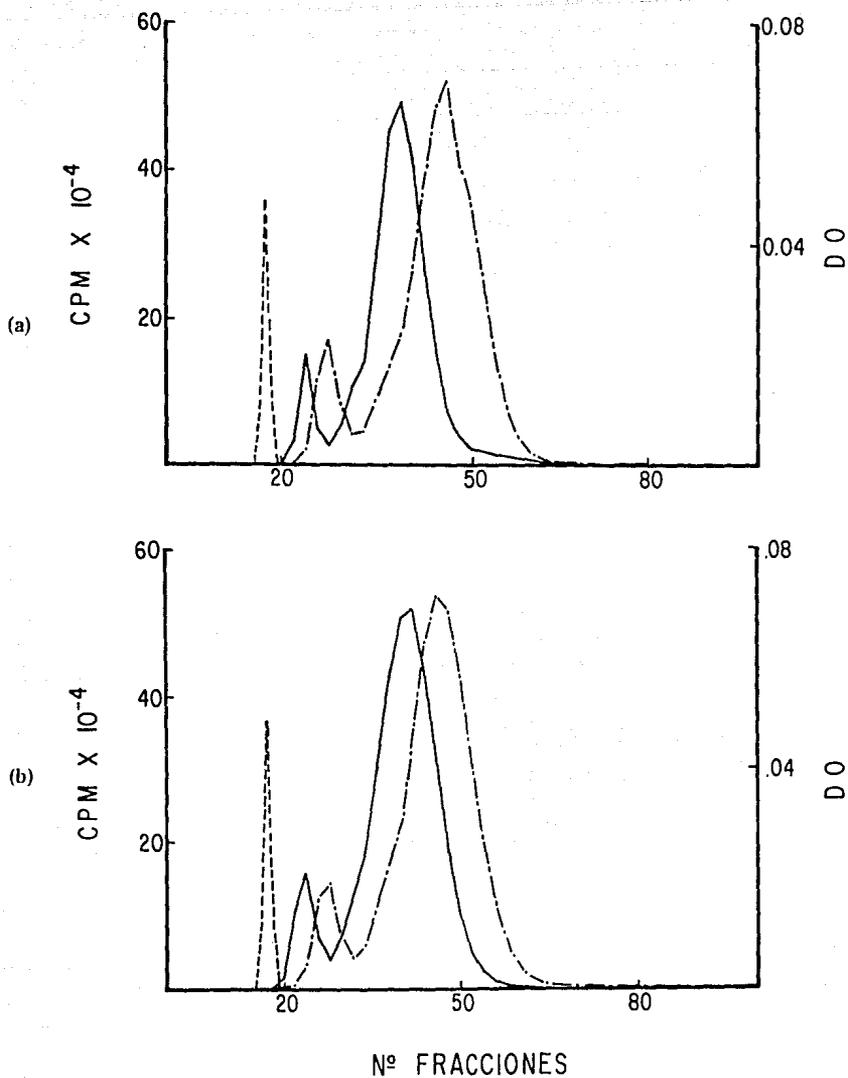


Figura 27. Patrón de elución en Sephadex G-10 de ³H-5-FU mezclado con anticuerpos anti-DNP desnaturalizados: a) con GuHCl (—) y b) con calor (— · —). Dextrán azul (- - -), ³5-FU-solo (- · - ·).

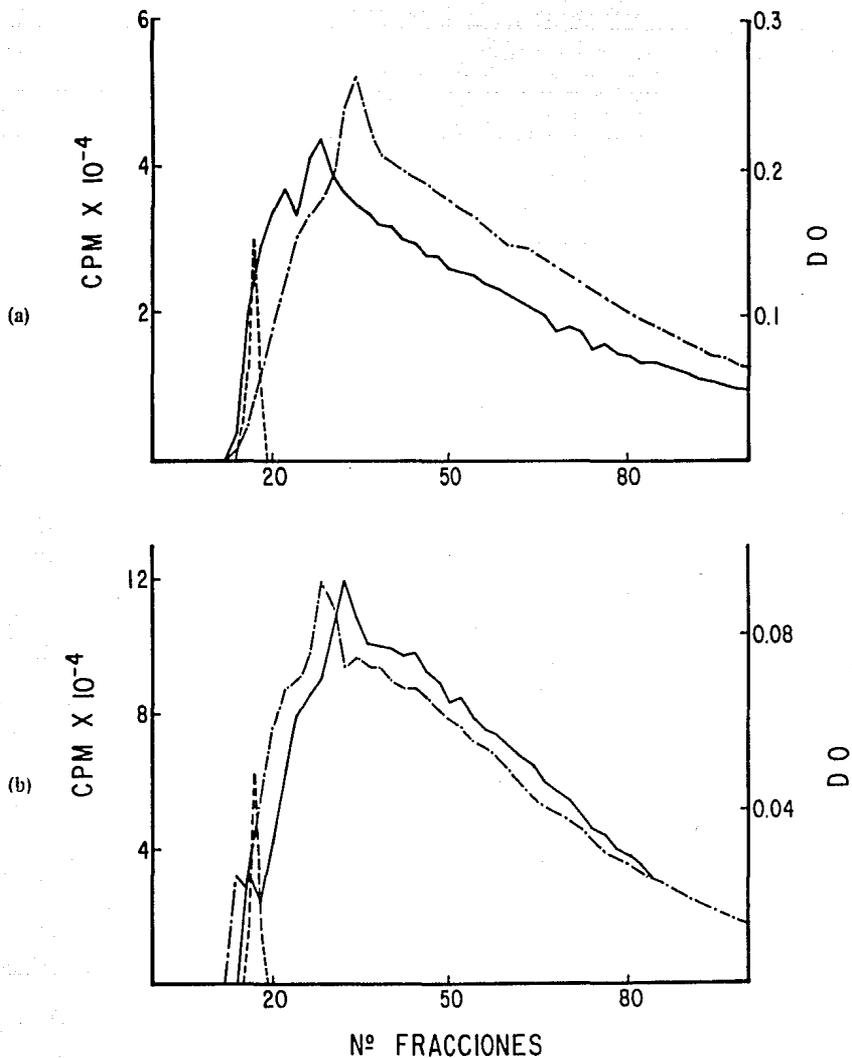


Figura 28. Patrón de elución en Sephadex G-10 de ^3H -MTX mezclado con anticuerpos anti-DNP desnaturalizados: a) con CuHCl (—) y b) con calor (—). Dextrán azul (---), ^3H -MTX solo (—·—).

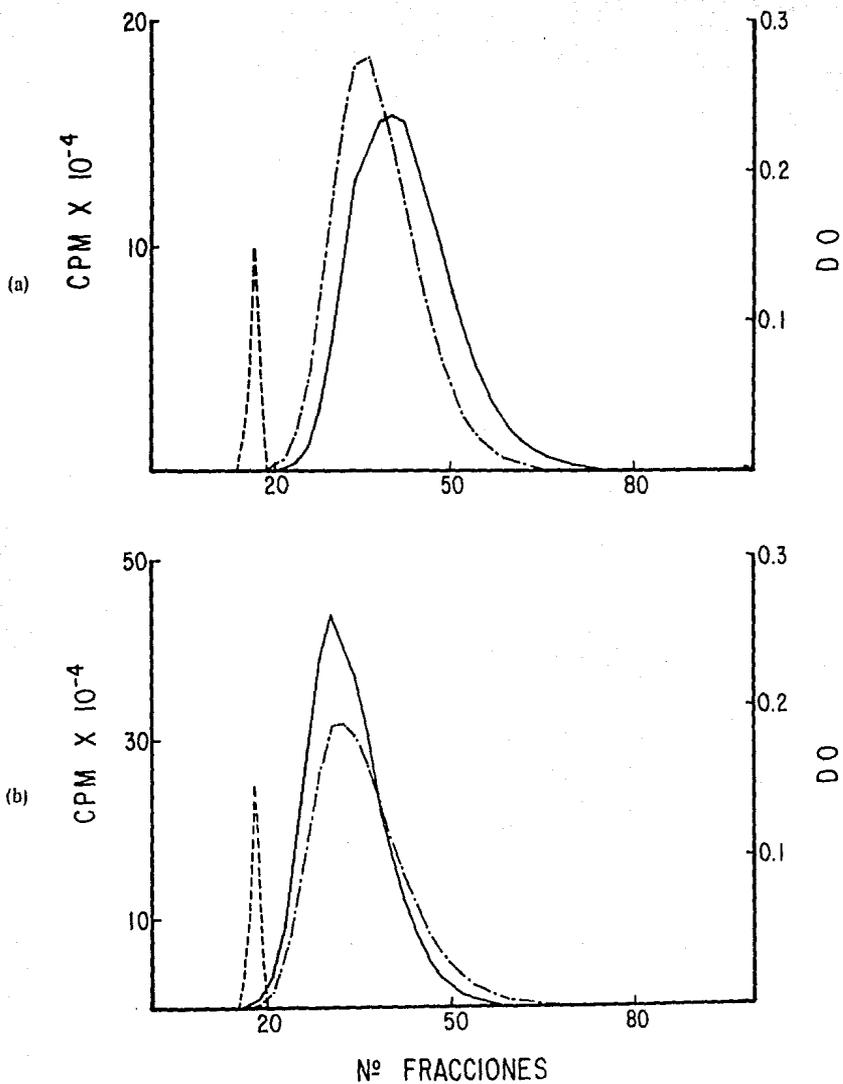


Figura 29. Patrón de elución en Sephadex G-10 de ^3H -CTA mezclado con anticuerpos anti-DNP desnaturalizados: a) con GuHCl (—) y b) con calor (—). Dextrán azul (---), ^3H -CTA solo (-.-).



(a)



(b)

Figura 30. a) Precipitación en agar de anticuerpos anti-DNP desnaturalizados con calor y renaturalizados en presencia de ^3H -CTA.
b) Fluorografía de las bandas de precipitación. Se observa incorporación de radiactividad en las bandas de precipitación de los anticuerpos anti-DNP debido a la asociación de ^3H -CTA.

DISCUSION

En este trabajo se hace un estudio sobre la formación de conjugados no-covalentes entre 3 drogas citotóxicas y anticuerpos. La ventaja de poder usar estos conjugados para fines terapéuticos radica en la mayor accesibilidad de la droga a su blanco, por la relativa facilidad de disociación de las uniones no-covalentes a diferencia de un conjugado covalente, el cual requiere de mayor energía para liberar la droga y además disminuye la posibilidad de que ésta conserve su actividad citotóxica.

D) FIJACION DE 5-FU, MTX y CTA a IgG BOVINA

De los experimentos de fijación de las tres drogas citotóxicas a IgG bovina estudiados por diálisis en equilibrio a $\text{pH}=7.2$, únicamente hay asociación no-covalente droga-anticuerpo con 5-FU. En las figuras 6 y 7 se observa claramente la diferencia entre las curvas donde sí hubo fijación de 5-FU y la ausencia de fijación de MTX y CTA a IgG bovina en las mismas condiciones fisicoquímicas.

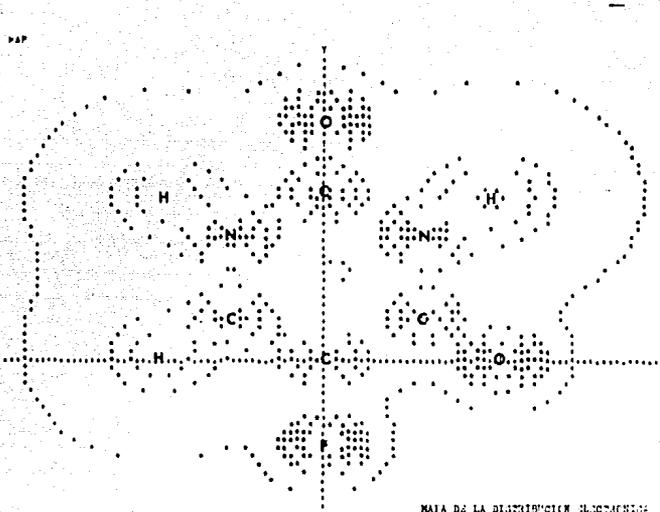
El tipo de conjugados que se obtuvieron con 5-FU fue de un bajo grado de acoplamiento, pues se necesitan de 10 a 100 moléculas de IgG para pegar una de 5-FU con afinidad variable. Esto indica distintos tipos de sitios de fijación, unos de alta afinidad presentes en una de cada 100 moléculas de IgG, y otros más abundantes pero de menor afinidad presentes en una proporción de uno por cada 10 moléculas de proteína. Posiblemente esta variación provenga de la gran

heterogeneidad de las poblaciones de inmunoglobulinas no seleccionadas, y en el tipo de interacción no covalente entre la droga y el anticuerpo. Es probable que la interacción entre 5-FU e IgG sea de tipo electrostático pues a $\text{pH}=7.2$ una población de IgG presenta densidad de carga superficial positiva y el 5-FU presenta regiones con densidad de carga negativa, como se muestra en el estudio teórico de la distribución electrónica superficial de la molécula de 5-FU (Figura 31).

II) FIJACION DE 5-FU A ANTICUERPOS ANTI-DNP

No se encontró que el 5-FU se asociara a los anticuerpos anti-DNP en las mismas condiciones fisicoquímicas que lo hacía con IgG bovina, ni tampoco a diferentes concentraciones de anticuerpos. Este cambio en el comportamiento de la droga respecto a la interacción con los anticuerpos se explica por la selección de poblaciones de Ig con diferente distribución de carga superficial debido a la purificación de anticuerpos anti-DNP. La variación de la carga superficial que sufren los anticuerpos con la purificación se manifestó por inmuno-electroforesis, observándose un cambio en el patrón de migración de los anticuerpos anti-DNP respecto a las gammaglobulinas totales (Figura 32).

Con el propósito de extender la búsqueda de los conjugados no covalentes droga-anticuerpo, se estudió la influencia del pH y la desnaturalización reversible de los anticuerpos, sobre la fijación de 5-FU, MTX y CTA a los anticuerpos anti-DNP, con el fin de encontrar las condiciones fisicoquímicas óptimas de la interacción droga-anticuerpos anti-DNP.



MAPA DE LA DISTRIBUCIÓN ELECTRONICA
DE LOS ATOMOS DE 5-FU

Figura 31. Distribución electrónica superficial de 5-FU. (Valentino Omaña).

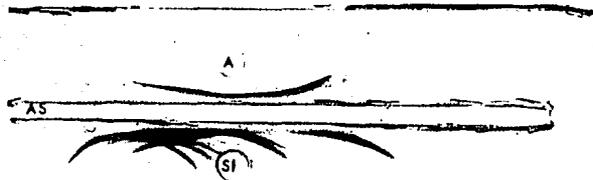


Figura 32. Inmunolectroforesis en agar de Anticuerpos anti-DNP de borrego. A) Anticuerpo anti-DNP borrego; AS) anti-suero de borrego; ST) suero total de borrego. Se observa que los Anticuerpos puros (A) tienen un menor desplazamiento electroforético que cuando están mezclados en el suero inmune (SI).

III) EFECTO DEL pH EN LA FIJACION DE 5-FU, MTX Y CTA A ANTI-CUERPOS ANTI-DNP

En esta parte del trabajo únicamente se encontró formación de conjugados con anticuerpos anti-DNP y 5-FU a pH=6 y MTX a pH=6 y 7.2.

a) *Conjugados 5-FU-Ac anti-DNP*

El hecho de que solo a pH=6 se formen conjugados y no a otros pHs, sugiere que a pH=6 las moléculas de anticuerpos anti-DNP adquieren mayor disponibilidad de densidad de carga positiva superficial, permitiendo esto la interacción electrostática con el 5-FU. Sin embargo, esta interacción debe ser muy lábil pues no se observa al usar otro métodos para demostrar la formación de conjugados. Al tratar de separar conjugados 5-FU-anticuerpos anti-DNP de la mezcla de reacción por filtración en Sephadex y por precipitación de los anticuerpos en DID, se encontró que la dilución que ocurre a través del gel y la difusión en el agar son suficientes para disociar la pequeña cantidad de droga que se ha unido a los anticuerpos. Lo mismo sucede con la seda-DNP, ya que al lavarla después de la incubación con la mezcla de anticuerpos anti-DNP y H^3 5-FU la radiactividad asociada es igual que en la seda blanca.

b) *Conjugados MTX-Ac anti-DNP*

Estos conjugados se presentan a dos pHs diferentes. A pH=6 se observan dos tipos de conjugados y a pH=7.2 uno sólo. En ambos casos tienen un mayor grado de acoplamiento droga-anticuerpo que los obtenidos con 5-FU, aunque sus constantes de afinidad son más bajas. Este comportamiento del

calentamiento puede producir solo alargamientos de ciertas partes de la proteína y/o formación de cavidades inertes (68), no siendo la rotación específica el mejor método para detectar este tipo de cambios en las moléculas de proteína.

A nuestro juicio los métodos empleados para detectar la formación de conjugados con las tres drogas citotóxicas y los anticuerpos desnaturalizados reversiblemente no fueron exhaustivos por limitaciones de mercado. Así fue que únicamente se pudo detectar la formación de un conjugado con CTA y anticuerpos desnaturalizados térmicamente. No descartando la posibilidad de que se hubieran formado conjugados con las otras drogas y con anticuerpos desnaturalizados, tanto por GuHCl como por calor. Es posible que el efecto de la dilución en la cromatografía de exclusión y de la difusión en el agar, no permitió ver la formación de algún conjugado, debido a las cantidades tan pequeñas de anticuerpos que se manejaron y a las bajas actividades específicas de las drogas tritadas. Otro problema que se presentó fue la interacción de MTX y CTA con la matriz del gel; este efecto se observó en los patrones de elución de ambas drogas, las cuales empezaron a salir en el volumen de exclusión, lo que pudo enmascarar pequeñas cantidades de conjugados.

CONCLUSION

Recordando que el objetivo de este trabajo era lograr conjugados no covalentes droga-anticuerpos, podemos concluir que se logró la formación de conjugados de este tipo con 5-FU e IgG bovina y de 5-FU, MTX y CTA con anticuerpos anti-DNP, aunque en condiciones fisicoquímicas diferentes. Para el caso de los conjugados con CTA y anticuerpos anti-DNP aún no se determina el grado de conjugación de la droga al anticuerpo.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los conjugados obtenidos con 5-FU serían los más adecuados para un futuro uso terapéutico en la quimioterapia selectiva de algunas neoplasias por las siguientes observaciones:

- 1) La dosis terapéutica máxima empleada actualmente de 5-FU es de 1g diario durante 5 días. No hay un estudio cuantitativo sobre la distribución y catabolismo de la droga, pero por medio de una suposición simple podemos inferir que en una persona con un peso de 70 kg, y un volumen sanguíneo de 5600 ml, en cierto momento el 5-FU alcanzaría una concentración de .178 mg/ml. Este valor es aproximadamente de mil a diez mil veces mayor que las cantidades necesarias de 5-FU libre (10^{-4} , 10^{-5} mg/ml) para obtener los conjugados con 5-FU y anticuerpos.
- 2) En un símil de tumor usando seda-DNP colocada en diversos órganos de un cuyo (71) se encontró que 1 de cada 10^5 moléculas de anticuerpos anti-DNP llegan a su blanco. Si se administrase una cantidad de anticuerpos anti-DNP

de 10^{-5} M, y pensando en el número de Avogadro llegarían a su blanco 10^{13} moléculas de Ac. Aunque los valores de n obtenidos para los conjugados son bajos (aproximadamente 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), tomando en cuenta la observación anterior lograríamos concentrar en el peor de los casos (cuando n es aproximadamente 10^{-3}) en una área específica de 7.88 mm^2 de seda-DNP, 10^{10} moléculas de 5-FU.

Si ahora tomamos como ejemplo una masa tumoral de 3 a 5 mm, formada por 2.37×10^6 células de un tamaño promedio de 30μ tendrían una superficie total de exposición a la droga 853 veces mayor que la seda-DNP que se usa como blanco "in vivo" (71). Por lo tanto, llegarían al tumor aproximadamente 10^{13} moléculas de 5-FU.

Por lo anterior cabe un cierto optimismo sobre la viabilidad de lograr concentraciones tóxicas de 5-FU en la intimidad de un tumor por medio de los conjugados 5-FU-anticuerpos sin alcanzar concentraciones tóxicas en otros compartimientos orgánicos.

Para evaluar si los conjugados con 5-FU y anticuerpos son ya un instrumento de valor terapéutico, se propone el uso de un tumor experimental. E. Celis y colaboradores (72) encontraron que células de mieloma crecidas en forma de tumor de ascitis en ratones BALB/c sintetizan una glicoproteína superficial de peso molecular de 160 000 daltones (gp 160). Por lo tanto, se propone usar como modelo experimental al mieloma LPC-1 en ratones BALB/c y anticuerpos anti-gp 160 acoplados con 5-FU, lo que nos permitiría conocer el valor de los conjugados para la regresión de una neoplasia experimental.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Senn H. J.: Possibilities and limits of neoplasm drug therapy. Praxis 61: 877-83, 1972.
- 2.- Gregoriadis G.: Targeting of drugs. Nature vol. 265:407-410, 1977.
- 3.- Ghose T., Path F.R.C., Blair A.H.: Antibody-linked cytotoxic agents in the treatment of cancer; current status and future prospects. J. Natl Cancer Inst. 61:657-676, 1978.
- 4.- Szeckerke M., Driscoll J.S.: The use of macromolecules as carriers of anti-tumor drugs. Europ J. Cancer vol. 13:529-537, 1977.
- 5.- Szeckerke M., Wade R., Whisson M.E.: The use of macromolecules as carriers of cytotoxic groups (Part I). Conjugates of nitrogen mustards with proteins, polypeptidyl proteins and polypeptides. Neoplasma vol. 19:199-209, 1972.
- 6.- Szeckerke M., Wade R., Whisson M.E.: The use of macromolecules as carrier of cytotoxic groups (Part II). Nitrogen mustard-Protein complexes. Neoplasma vol. 19:211-215, 1972.
- 7.- Fendler J.H., Romero A.: Liposomes as drug carriers. Life Sciences vol. 20:1109-1120, 1977.
- 8.- Nicolson G.L.: The interactions of lectins with animal cell surfaces. Int. Rev. Cytol 39:90-190, 1974.
- 9.- Kitao T., Hattori K.: Concanavalina A as carrier of daunomycin. Nature vol. 265:81-82, 1977.
- 10.- Rapin A.M., Burger M.M.: Tumor cell surfaces: General alterations detected by agglutinins. Adv. Cancer Res. 20:1-92, 1974.
- 11.- Varge J.M., Asato N., Lande S., et al: Melanotropin-daunomycin conjugate shows receptor-mediated cytotoxicity in cultured murine melanoma cells. Nature 265:56-58, 1977.
- 12.- Knowles D.M., Sullivan T. J., Parker C.W., et al: In vitro antibody-enzyme conjugates with specific bactericidal activity. J. Clin Invest. 52:1443-1452, 1973.

- 13.- Sullivan T.J., Parker K.L., Parker C.W.: Specific killing of parasites by antibody-enzyme conjugates. *Res. Commun Chum Pathol Pharmacol* 6:709-717, 1973.
- 14.- Papachristou D., Zaki A.F., Fortner J.G.: Chlorambucil-carrying ALG as an immunosuppressive agent in the rat. *Transplant Proc.* 9:1059-1062, 1977.
- 15.- Hirschberg H., Rowland G., Thorsby E.: In vitro immunosuppressive effects of cytotoxic agents conjugated to antihuman lymphocyte globulin. *Transplantation* vol. 26:292-294, 1978.
- 16.- Ehrlich P.: A general review of the recent work in immunity. In *Collected Papers of Paul Ehrlich*, vol. 2: Immunology and Cancer Research. London: Pergamon Press, pp. 442-447, 1956.
- 17.- Mathé G., Loc. T., Bernard J.: Effet sur la leucémie 1210 de la souris d'une combinaison par diazotation d' A-méthoptérine et de γ -globulines de hamsters porteurs de cette leucémie par hétérogreffe. *C.R. Acad. Sci.* vol. 246:1626-1628, 1958.
- 18.- Szekerke M.: Some serum protein nitrogen mustard complexes with high chemotherapeutic selectivity. *Nature* vol. 215:1303-1304, 1967.
- 19.- Flechner I.: The cure and concomitant immunization of mice bearing Ehrlich ascites tumors by treatment with and antibody-alkylating agent complex. *Europ J. Cancer* vol. 9:741-745, 1973.
- 20.- Linford J.H., Berczi I., Israels L.G.: An alkylating agent-globulin conjugate with both alkylating and antibody activity. *J. Natl. Cancer Inst.* vol. 52:1665-1667, 1974.
- 21.- Ross W.C.J.: The conjugation of chlorambucil with human γ -globulin. *Chem. Biol. Interactions* vol. 10:169-172, 1975.
- 22.- Dullens H.F., De Weger R.A., Vennegoor C., Den Otter W.: Anti-tumour effect of chlorambucil-antibody complexes in a murine melanoma system. *Europ J. Cancer* vol. 15:69-75, 1979.
- 23.- Ghose T., Cerini M.: Radiosensitization of Ehrlich Ascites tumour cells by specific antibody. *Nature* vol. 222:993-994, 1969.

- 24.- Ghose T., Path R.C., Nigam S.P.: Antibody as carrier of chlorambucil. *Cancer* vol. 29:1398-1440, 1972.
- 25.- Ghose T., Tai J., Guclu A., Norvell S.T., Bodurtha A., Aquino J., MacDonald A.S.: Antibodies as carriers of radionuclides and cytotoxic drugs in the treatment and diagnosis of cancer. *International cont. on immunothoe of cancer., Ann N.Y., Acad. Sci.* vol. 277:671-689, 1976.
- 26.- Ghose T., Guclu A.: Cure of a mouse lymphoma with radio-iodinated antibody. *Europ J. Cancer* vol. 10:787-792, 1974.
- 27.- Guclu A., Tai J., Ghose T.: Endocytosis of chlorambucil-bound anti-tumor globulin following "capping" in EL4 lymphoma cells. *Immunol Comm.* vol. 4:229-242, 1975.
- 28.- Ghose T., Guclu A., Tai J., Mac Donald A.S., Norvell S.T., Aquino J.: Antibody as carrier of ^{131}I in cancer diagnosis and treatment. *Cancer* vol. 36:1646-1657, 1975.
- 29.- Ghose T., Norvell S.T., Guclu A., MacDonald A.S.: Immunochemotherapy of human malignant melanoma with chlorambucil-carrying antibody. *Europ J. Cancer* vol. 11:321-326, 1975.
- 30.- Ghose T., Guclu A., Tai J.: Suppression of an AKR lymphoma by antibody and chlorambucil. *J. Natl. cancer Inst.* vol. 55:1353-1357, 1975.
- 31.- Guclu A., Ghose T., Tai J., Mammen M.: Binding of chlorambucil with antitumor globulins and its effect on drug and antibody activities. *Europ J. Cancer* vol. 12:95-100, 1976.
- 32.- Ghose T., Guclu A., Tai J., Mammen M., Norvell S.T.: Immunoprophylaxis and immunotherapy of EL4 lymphoma. *Europ J. Cancer* vol. 13:925-935, 1977.
- 33.- Philpott G.W., Shearer W.T., Bower R.J., Parker C.W.: Selective cytotoxicity of hapten-substituted cells with an antibody-enzyme conjugate. *J. Immunol.* vol. 111:921-929, 1973.
- 34.- Philpott G.W., Bower R.J., Parker C.W.: Improved selective cytotoxicity with an antibody-diphtheria toxin conjugate. *Surgery* vol. 73:928-935, 1973.

- 35.- Philpott G.W., Bower K.J. Parker C.W.: Selective iodination and cytotoxicity of tumor cells with an antibody-enzyme conjugate. *Surgery* vol. 74:51-58, 1973.
- 36.- Shearer W.T., Turnbaugh T.R., Coleman W.E., Philpott G.W., Parker C.W.: Cytotoxicity with antibody-glucose oxidase conjugates specific for a human colonic cancer and carcino-embryonic antigen. *Int J. Cancer* vol. 14:539-547, 1974.
- 37.- Philpott G.W., Bower R.J., Parker K.L. Shearer W.T., Parker C.W.: Affinity cytotoxicity of tumor cells with antibody-glucose oxidase conjugates, peroxidase, and arspenamine. *Cancer Res.* vol. 34:2159-2169, 1974.
- 38.- Philpott G.W., Grass E.H., Parker C.W.: Affinity cytotoxicity with an alcohol dehydrogenase-antibody conjugate. *Cancer Res.* vol. 39:2084-2089, 1979.
- 39.- Davies D.A.L., O'Neill G.J.: In vivo in vitro effects of tumour specific antibodies with chlorambucil. *Br. J. Cancer* vol. 28, Suppl I: 285-298, 1973.
- 40.- Davies D.A.L., Buckham S., Manstone A.J.: Protection of mice against syngeneic lymphomata: II. Collaboration between drugs and antibodies. *Br.J. Cancer* vol. 30:305-311, 1974.
- 41.- Davies D.A.L.: The combined effect of drugs and tumor-specific antibodies in protection against a mouse lymphoma. *Cancer Res* vol. 34:3040-3043, 1974.
- 42.- Rowland G.F., O'Neill G.J., Davies D.A.L.: Suppression of tumour growth in mice by a drug-antibody conjugate using a novel approach to linkage. *Nature* vol. 255:487-488, 1975.
- 43.- Davies D.A.L., O'Neill G.J.: Specific cancer therapy by drugs attached to tumor-specific antibodies. *International conf. on immunothef. of Cancer., Ann N.Y. Acad Sci.* vol. 277:670. 1976.
- 44.- Hurwitz E., Levy R., Maron R., Eilchek M., Arnon R., Sela M.: The Covalent binding of daunomycin and adriamycin to antibodies, with retention of both drug and antibody activities. *Cancer Res* vol. 35:1175-1181, 1975.

ESTA TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

- 45.- Levy R., Hurwitz E., Maron R., Arnon R., Sela M.: The specific cytotoxic effects of daunomycin conjugated to antitumor antibodies. *Cancer Res* vol. 35:1182-1186, 1975.
- 46.- Hurwitz E., Maron R., Arnon R., Sela M.: FAB dimers of antitumor immunoglobulins as covalent carriers of daunomycin. *Cancer Biochem. Biophys* vol. 1:197-202, 1976.
- 47.- Arnon R.: Novel application for antibodies. *Biotechnological applications of proteins and enzymes*. Academic Press, 1977 Eds. Bohak Z. and Sharon N.
- 48.- Hurwitz E., Maron R., Arnon R., Wilchek M. Sela M.: Daunomycin-immunoglobulin conjugates uptake and activity in vitro. *Europ J. Cancer* vol. 14:1213-1220, 1978.
- 49.- Moolten F.L., Cooperband S.R.: Selective destruction of target cells by diphtheria toxin conjugated to antibody directed against antigens on the cells. *Science* vol. 169:68-70, 1970.
- 50.- Moolten F.L., Capparell N.J., Cooperband S.R.: Antitumor effects of antibody-diphtheria toxin conjugates: Use of hapten-coated tumor cells as an antigenic target. *J. Natl. Cancer Inst.* vol. 49:1057-1062, 1972.
- 51.- Moolten F.L., Zajdel S., Cooperband S.: Immunotherapy of experimental animal tumors with antitumor antibodies conjugated to diphtheria toxin or ricin. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 690-699
- 52.- Flickinger R.A., Trost S.R.: Cytotoxicity of antibody-phospholipase C conjugates on cultured friend leukemia cells. *Cur J. Cancer* 12:159-160, 1976.
- 53.- Nagy B., Ban J., Brdar B.: Fibrinolysis associated with human neoplasia: Production of plasminogen activator by human tumours. *Int. J. Cancer* 19:614-629, 1977.
- 54.- Little C., Aurebek B.: Inactivation of phospholipase C from *Bacillus cereus* by a carboxyl group modifying reagent. *Acta Chem. Scand [B]* 31:273-277, 1977.

- 55.- Williams C.A., Chase M.W. (eds): *Methods in Immunology and Immunochemistry, I.* Academic Press, New York, 1969.
- 56.- Williams C.A., Chase M.W. (eds): *Methods in Immunology and Immunochemistry, II.* Academic Press, New York, 1970.
- 57.- Williams C.A., Chase M.W. (eds): *Methods in Immunology and Immunochemistry, III.* Academic Press, New York, 1971.
- 58.- March S.S., Parikh I., Cuatrecasas P.: A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal Biochem.* 60:149-152, 1974.
- 59.- Eisen H.N.: Preparation of purified anti-2,4-dinitrophenyl antibodies. *Methods in Medical Research.* (H.N. Eisen ed.) vol. 10: 94-102, 1964.
- 60.- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A. L., Randall R.F.: Protein measurement with the folinpheno reagent. *J Biol. Chem.* 193:265-275, 1951.
- 61.- Laskey R.A., Mills A.D.: Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur J Biochem.* vol. 56:336-341, 1975.
- 62.- Scatchard G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Am N.Y. Acad. Sci.* 51:660-672, 1949.
- 63.- Klotz I.M.: *Protein Interactions. The Protein I, 727.* Academic Press. New York. Neurath H. and Bailey K. (eds.), 1953.
- 64.- Karush F., Sonenberg M.: Interaction of homologous alkyl sulfates with bovine serum albumin. *J Am. Chem. Soc.* 71:1369-1376, 1949.
- 65.- Sips R.: On the structure of a catalyst surface. *J. Chem. Phys.* 16:490-495, 1948.
- 66.- Sips R.: On the structure of a catalyst surface. II. *J. Chem Phys.* 18: 1024-1026, 1950.
- 67.- Ortíz Flores M.G.: *Desnaturalización de Proteínas y su reversibilidad (Revisión bibliográfica).* Tesis profesional. Facultad de Química U.A.G., 1978.

- 68.- Joly M.: A physico-Chemical approach to the denaturation of proteins. Academic Press, London and N.Y., 1965.
- 69.- Whitney P.L., Tanford C.: Recovery of specific activity after complete unfolding and reduction of an antibody fragment. *Biochem.* 53:524-532, 1965.
- 70.- Buckley C.E., Whitney P.L., Tanford C.: The unfolding and renaturation of a specific univalent antibody fragment. *Biochem.* 50:827-834, 1963.
- 71.- Yakoleff Greenhouse V. and Larralde C.: Binding kinetics of anti-DNP antibody "in vivo" (Abstract). IV international Congress of Immunology. Paris, France. July 21-26, 1980.
- 72.- Celis E., Chang T.W., Eisen H.N.: III Periodic production of a cell surface glycoprotein and changes in reactivity with cytotoxic T cells and anti-H-2^d sera. *J. Immunol.* 122:2245-2250, 1979.

A P E N D I C E I

AGENTES CITOTÓXICOS QUE HAN SIDO UNIDOS A ANTICUERPOS

Agentes citotóxicos con diversos mecanismos de acción han sido unidos a anticuerpos por medio de enlaces covalentes y no covalentes (Tabla I) (3).

Agentes alquilantes. Estas moléculas constituyen un grupo de compuestos altamente reactivos, capaces de sustituir átomos de H en grupos nucleofílicos (-NH, -SH) comunes en moléculas biológicas como proteínas y ácidos nucleicos, la gran citotoxicidad de estos agentes se ha atribuido a la formación de enlaces intercadenas del DNA a través de la posición 7 de las guaninas. Los más usados para formar conjugados con anticuerpos son *clorambucil*, *trenimon* y *PDM* (fenilendiamino mostaza).

Antibióticos. Estos ejercen su acción citotóxica por intercalación en el DNA al unirse a los polinucleótidos, bloqueando la transcripción de nuevo DNA o RNA, y algunos también por modificación de la superficie celular. Se han unido a anticuerpos antibióticos antraciclínicos como *daunorrubicina* y *adriamicina*; la bleomicina es un buen candidato para formar conjugados con anticuerpos antitumorales ya que su orientación estérica puede permitir uno o dos grupos amino libres en la superficie que pueden unirse a los anticuerpos.

Antimetabolitos. Análogos estructurales de metabolitos interfieren con una amplia variedad de reacciones celulares bloqueando directamente el creci-

Tabla II. AGENTES CITOTOXICOS QUE HAN SIDO UNIDOS A ANTICUERPOS

| AGENTE CITOTOXICO | METODO DE ENLACE | SISTEMA DE PRUEBA Y FUENTE DE ANTICUERPOS | COMENTARIOS |
|-------------------|--------------------------------|--|--|
| Methotrexate | Diazo reacción | Leucemia L1210 en ratones DBA; Ac de hamster. | Se prolongó la sobrevivencia de ratones tratados con MTX- Ac y no con Ig normal- MTX ni MTX solo o Ac solo. |
| " | " | Sarcoma de células reticulares humanas; Ac de conejo. | MTX-Ac se unieron al tumor in vitro. |
| " | Diazo reacción y carbodiimida. | Leucemia L1210; Ac de conejo. | Se prolongó la sobrevivencia de ratones inyectados con células L1210 y MTX-Ac comparando con MTX solo o Ac solo. |
| Toxina diftérica | Tolueno-diisocianato. | Células de riñón de mono infectadas con virus de las paperas; Ac anti-virus de cuido. | Toxicidad selectiva in vitro. |
| " | Glutaraldehido | Células de sarcoma de hamster cubiertas con DNP; Ac anti-DNP de conejo. | Inhibición del tumor inyectando al mismo tiempo células-DNP y Ac. |
| " | " | Células de sarcoma o linfoma de hamster transformadas con virus 40 de simio; Ac de hamster y conejo. | Inhibición parcial in vivo de inoculaciones de células de sarcoma: regresión de linfomas establecidos. |

| AGENTE CITOTOXICO | METODOS DE ENLACE | SISTEMA DE PRUEBA Y FUENTE DE ANTI-CUERPOS | COMENTARIOS |
|-------------------|---------------------|---|---|
| Glucooxidasa | Dietil malonimidato | Células HEp-2 y HeLa cubiertas con TNP; Ac anti-TNP de conejo. | Citotoxicidad selectiva para células tumorales -TNP en presencia de lactoperoxidasa y I in vitro e in vivo. |
| " | " | Células HEp-2, HeLa y HT29 cubiertas con TNP en presencia de peroxidasa y arsfenamina; Ac anti-TNP de conejo y anti-CEA de cabra. | Muerte selectiva de células con el antígeno apropiado in vitro. |
| " | " | Células de cáncer de colon humano; Ac anti-CEA y anti-tumor de cabra y conejo. | Iodinación selectiva y citotoxicidad con enzima-Ac in vitro. |
| " | " | Cáncer de colon humano in vivo e in vitro; Ac anti-CEA de cabra purificados por afinidad. | Localización preferencial de enzima-Ac anti-CEA en tumores que producen CEA. |
| Clorambucil | Enlace no covalente | Carcinoma de Ehrlich en ratones BALB/c; Ac de conejo. | Inhibición selectiva del tumor in vitro e in vivo por el conjugado y no por la droga o el Ac solo ni por la droga y el Ac sin unir. |

| AGENTE CITOTOXICO | METODO DE ENLACE | SISTEMA DE PRUEBA Y FUENTE DE ANTI- CUERPOS | COMENTARIOS |
|-------------------|---------------------|--|--|
| Clorambucil | Enlace no covalente | Linfoma EL4 en ratones C57BL; Ac de conejo. | Inhibición selectiva del tumor in vitro e in vivo por el conjugado y no por la droga o el Ac solo; pero solo in vitro una verdadera dirección al blanco. |
| " | " | Linfoma L2 en ratones AKR; Ac de conejo. | El conjugado más efectivo que la droga y el Ac sin unir. |
| " | " | Células de polioma - BHK21/C13 trans - formadas; Ac de conejo. | Citotoxicidad incrementada por la droga y el Ac juntos independiente del enlace. |
| " | " | Hepatoma Novikoff - en ratas Holtzman; - Ac de conejo. | Igual que arriba. |
| " | " | Melanoma humano - diseminado; Ac de cabra y conejo. | Regresión en 2/13 pacientes; prolongación de supervivencia comparando con un grupo tratado con DTIC. |
| " | Mezclando | Melanoma maligno - diseminado humano; Ac de cabra. | Resultados no evaluables por diferentes modalidades en el tratamiento. |

| AGENTES CITOTOXICOS | METODO DE ENLACE | SISTEMA DE PRUEBA Y FUENTE DE ANTICUERPOS | COMENTARIOS |
|---------------------|---|--|--|
| Clorambucil | Mezclando a pH=7.1 por 4 hs (temperatura ambiente). | Leucemia de células cebadas humanas; - Ac de borrego | Ningún efecto con una inyección de 0.25 mg de clorambucil ligado a 5 mg de anti-IgE. |
| " | Mezclando | 1 paciente con melanoma diseminado; - Ac autólogos. | Inhibición in vitro de células tumorales autólogas: resultados no evaluables in vivo. |
| " | " | 3 pacientes con neuroblastoma; Ac de -- sus padres. | Inhibición del tumor in vitro y regresión en los 3 pacientes. |
| " | Enlace covalente con ECDI | Linfoma EL 4 en ratones C57BL; Ac de conejo. | Inhibición del tumor in vivo. |
| " | " | Neuroblastoma humano; Ac alógenicos. | Inhibición del tumor in vitro y en un paciente. |
| Trenimon | Enlace covalente con ditiotreitól | Sarcoma inducido - con 3-metilcolantreno en hamsters; Ac - de conejo | Citotoxicidad selectiva in vitro por el conjugado comparando con Ac o trenimon solos. |
| " | " | Linfoma L5178Y en ratones DBA; Ac de conejo. | Inhibición selectiva del tumor in vitro e in vivo por el conjugado comparando con la droga o el Ac solo o droga y Ac sin unir. |

| AGENTE CITOTOXICO | METODO DE ENLACE | SISTEMA DE PRUEBA Y FUENTE DE ANTI- CUERPOS | COMENTARIOS |
|----------------------------------|---|---|---|
| PDM (Fenilendiami- nomostaza) | Sustitución múltiple de la droga en ác. -- poliglutámico por - carbodiimida, segui- do por acoplamiento a Ac por ECDI. | Linfoma EL 4 en ra- tones C57BL; Ac de conejo. | Prolongación de sobrevida de rato- nes inoculados con el tumor y tratados con el conjugado com- parando con la droga o el Ac solos. |
| " | Sustitución múltiple de la droga en Dex- tran por CNBr, se- guido de acoplamiento a Ac por glutaral- dehido. | " | El conjugado fue más efectivo in vivo que la droga o el Ac solos o la droga y Ac sin unir. |
| Daunorrubicina y adriamicina | Formación de ductos por reducción con Na B ₄ entre Ac y la dro- ga oxidada con perio- dato. | Leucemia de células- B inducida química- mente en ratones - SJL, linfoma YAC en ratones cepa A y pla- macitoma PC 5 en - ratones BALB/c; Ac - de conejo. | Citotoxicidad se- lectiva por el con- jugado comparan- do con droga -BSA, droga o Ac solos, droga y Ac sin unir. |
| Rubidomicina (daunorrubicina) | Reacción con carbo- diimida. | Neuroblastoma huma- no in vitro; Ac aloge- nicos. | 100% de muerte de células tumo- rales. |
| " | Formación de ductos- por reducción con Na B ₄ entre Ac y la dro- ga oxidada con perio- dato | Linfoma por virus -- Yac Moloney en ra- tones de cepa A; frag- mentos (Fab) ₂ de -- conejo. | Retención de la actividad de la droga y de la es- pecificidad del Ac. |

| AGENTE CITOTOXICO | METODO DE ENLACE | SISTEMA DE PRUEBA Y FUENTE DE ANTI- CUERPOS | COMENTARIOS |
|-------------------|------------------|---|--|
| Fosfolipasa C | Glutaraldehído | Leucemia Friend en - ratones DBA; Ac - ratones DBA inmuni- zados con células tu- morales formaliniza- das. | Citotoxicidad in vitro para células de leucemia Friend. |

Tabla II. Evaluación de agentes citotóxicos que han sido unidos a anticuerpos anti-tumorales. T. Ghose, A.H. Blair., J. Natl Cáncer Inst.: 61, 3:659-658, 1978.

Abreviaciones: Ac = anticuerpos, MTX = methotrexate, DNP = dinitrofenol, TNP = trinitrofenol, BSA = albúmina sérica bovina, CEA = antígeno carcinoembrionario, ECDI = 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida.

miento celular, pero estas reacciones no son específicas de células tumorales, la administración de estos agentes en forma de conjugados con anticuerpos antitumorales permitiría una mayor selectividad de su toxicidad, por esta razón se han usado experimentalmente conjugados de anticuerpos con *methotrexate* (17).

Agentes con actividad sobre superficie celular. La conjugación de anticuerpos antitumorales con enzimas tales como fosfolipasas venenosas y toxinas lisogénicas bacterianas serían ideales, pues no es necesario su internalización a la célula ya que actúan a nivel de superficie celular. La actividad de las fosfolipasa para catalizar hidrólisis de fosfolípidos de superficie celular depende de las fuentes de la enzima, del origen de la célula expuesta y de las condiciones físico-químicas que la rodean. Se ha reportado que células de leucemia y linfomas son susceptibles bajo ciertas condiciones a fosfolipasa A_2 de Naja naja y la fosfolipasa C muestra cierta selectividad citotóxica hacia células tumorales, por lo que se han usado conjugados de *fosfolipasa C* con anticuerpos antitumorales (52).

Inhibidores de síntesis de proteínas. Sustancias como toxina diftérica que inhibe al factor EF_2 de la síntesis de proteínas, ha sido unida a anticuerpos siguiendo los propósitos originales de Ehrlich (49-51). Los conjugados muestran selectividad para células tumorales in vitro e in vivo, sin embargo, es una desventaja su gran tamaño y la afinidad de la cadena B para membranas plasmáticas en general, lo que hace que los conjugados sean tóxicos también para células normales. Una manera de evitar esto, es uniendo únicamente el fragmen-

to A que es el inhibidor del factor EF_2 y también es menos antigénico. Toxinas vegetales como las lectinas abrin y ricin inactivan a la subunidad 60 S ribosomal por medio de su cadena A, deteniendo la síntesis de proteínas y además se ha visto que tienen selectividad tóxica hacia varios tumores tanto experimentales como humanos, por esto la toxina *ricin* ha sido unida a anticuerpos antitumorales (51). También se ha sugerido formar conjugados con anticuerpos y amanitinas y faloidinas, polipéptidos cíclicos derivados de *Amanita phalloides* que inhiben a la RNA polimerasa II, y cuando se conjugan con albúmina tienen acción tóxica selectiva sobre células neoplásicas de alta actividad fagocítica.

Enzimas que transforman protoxinas a toxinas. Se han usado modelos de anticuerpos unidos a agentes antineoplásicos no convencionales como *glucooxidasa* unida a anticuerpos y en colaboración con *lactoperoxidasa* (o viceversa) convierten selectivamente derivadores arsenicales y haluros en agentes citotóxicos en el sitio del tumor (35-37).

APENDICE II

FIJACION DE MOLECULAS PEQUEÑAS A MACROMOLECULAS

Varios modelos teóricos pueden ser usados para describir el fenómeno de interacción de pequeñas moléculas con macromoléculas. La descripción matemática de la formación de complejos está basada en la teoría del equilibrio múltiple. Las cantidades experimentales de interés en el estudio del equilibrio múltiple son la relación molar de unión, definida como el número promedio de moles de ligando unido por mol de proteína, y la concentración de ligando en equilibrio con el ligando que está formando el complejo. Estas dos cantidades determinadas experimentalmente permiten calcular las constantes de asociación del ligando por el sitio o sitios en la proteína y también la energía libre de la formación del complejo. Cuando el enlace es medido como una función de la temperatura, otras cantidades termodinámicas, tales como entalpía y entropía de enlace también pueden ser determinadas.

I. Modelo de Scatchard (62)

Si una molécula de proteína tiene n sitios de fijación idénticos e independientes, la reacción puede ser descrita por:



La velocidad de formación del producto es:

$$v_1 = k_1 [P] [A] \quad (2)$$

y la velocidad de disociación:

$$v_2 = k_{-1} [PA] \quad (3)$$

en el equilibrio $v_1 = v_2$ por lo tanto:

$$k_1 [P] [A] = k_{-1} [PA] \quad (4)$$

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[PA]}{[P] [A]} = K \quad (5)$$

donde K es la constante de asociación o de afinidad en el equilibrio.

$$\text{Estableciendo que } n[P_t] = [P] + [PA] \quad (6)$$

donde $[P_t]$ es la concentración total de proteína tenemos que $n[P_t]$

= $[S_0]$ la concentración inicial total de sitios de fijación.

Por lo tanto:

$$[P] = [S_0] - [PA] \quad (7)$$

sustituyendo lo anterior en la ecuación (5):

$$K = \frac{[PA]}{([S_0] - [PA]) [A]} \quad (8)$$

y finalmente reorganizando términos para obtener una forma lineal:

$$\frac{[PA]}{[A]} = K [S_0] - K [PA] \quad (9)$$

Esta última ecuación llamada de Scatchard también puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{[P]}{[L]} = K [S_0] - K [P] \quad (10)$$

donde [P] es la cantidad de ligando pegado a los sitios de fijación y [L] es la cantidad de ligando libre. Y una gráfica de la ecuación (10) nos permite estimar a la constante de asociación K y a la concentración total de sitios de fijación [S₀].

II. Modelo de Klotz (63)

Ecuación general para determinar el grado de fijación de un ligando A a una Proteína. Una medida conveniente para el grado de combinación de A con la proteína es:

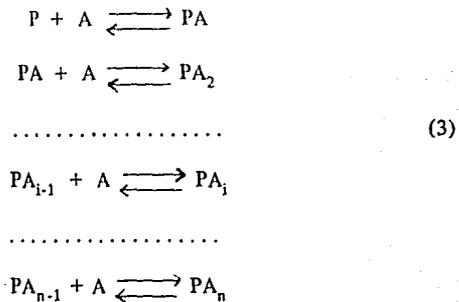
$$\frac{\text{moles combinados de A}}{\text{moles totales de Proteína}} = r \quad (1)$$

Puesto que el número de moles combinados de A es:

[PA] + 2 [PA₂] + 3 [PA₃] + ... + i [PA_i] + ... + n [PA_n] nosotros podemos escribir:

$$r = \frac{[PA] + 2 [PA_2] + \dots + i [PA_i] + \dots + n [PA_n]}{[P] + [PA] + [PA_2] + \dots + [PA_i] + \dots + [PA_n]} \quad (2)$$

En el equilibrio tenemos que:



Estos equilibrios pueden ser representados también en ecuaciones que definen sus constantes de equilibrio K.

$$K_1 = \frac{[PA]}{[P] [A]} \quad (4)$$

$$K_2 = \frac{[PA_2]}{[PA] [A]} \quad (5)$$

.....

$$K_i = \frac{[PA_i]}{[PA_{i-1}] [A]} \quad (6)$$

.....

$$K_n = \frac{[PA_n]}{[PA_{n-1}] [A]} \quad (7)$$

De esas ecuaciones podemos obtener las siguientes relaciones:

$$[PA] = K_1 [P] [A] \quad (8)$$

$$[PA_2] = K_2 [PA] [A] = K_1 K_2 [P] [A]^2 \quad (9)$$

.....

$$[PA_i] = K_i [PA_{i-1}] [A] = (K_1 K_2 \dots K_i) [P] [A]^i \quad (10)$$

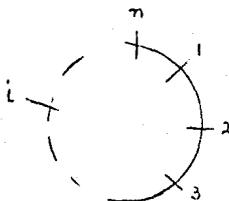
.....

$$[PA_n] = K_n [PA_{n-1}] [A] = (K_1 K_2 \dots K_{n-1} \dots K_n) [P] [A]^n \quad (11)$$

Relaciones entre las constantes de equilibrio en ausencia de interacciones.

Si todos los sitios de fijación son independiente entre si y tienen la misma afinidad intrínseca por A, entonces las constantes de equilibrio $K_1 \dots K_n$ están relacionadas. Estas relaciones pueden ser obtenidas fácilmente por aplicación de las reglas de combinaciones y permutaciones.

Si representamos a la molécula P en n sitios para la unión de moléculas A de la siguiente forma:



Es aparente que hay n posible formas de PA, dependiendo del sitio particular de P, al cual A está unido. Estos complejos pueden ser distinguidos por la notación $_1PA \dots _2PA \dots _nPA$, el número subscripto a la izquierda indica el sitio particular sobre P al cual A está unido.

Si las afinidades intrínsecas de los sitios son idénticas, entonces la constante de equilibrio, K, para la combinación



es la misma para la reacción



así

$$K = \frac{[{}_1PA]}{[P][A]} = \frac{[{}_2PA]}{[P][A]} = \dots = \frac{[{}_nPA]}{[P][A]} \quad (14)$$

ya que

$$[PA] = [{}_1PA] + [{}_2PA] + \dots + [{}_nPA] \quad (15)$$

la ecuación (4) es:

$$K_1 = \frac{[PA]}{[P][A]} = \frac{[{}_1PA] + [{}_2PA] + \dots + [{}_nPA]}{[P][A]}$$

o

$$K_1 = K + K + \dots + K = {}_nK \quad (16)$$

Así tenemos una relación entre K_1 y la constante intrínseca K . Una relación similar puede ser obtenida entre K_2 y K . Si examinamos el complejo PA_2 se encuentra que hay $\frac{n(n-1)}{2}$ formas posibles dependiendo de la combinación particular de dos sitios sobre P a los cuales están unidos dos moléculas de A . La cantidad $\frac{n(n-1)}{2}$ es derivada de la relación algebraica del número de posibles combinaciones de n sitios tomados a un tiempo.

$${}_nC_m = \frac{n!}{m!(n-m)!} \quad (17)$$

Este tipo de tratamiento puede ser generalizado a la constante K_1 .

$$K_i = \frac{[PA_i]}{[PA_{i-1}] [A]}$$

Para obtener la relación entre K_i y la constante intrínseca K , podemos determinar primero el número de posibles formas del complejo PA_i . Otra vez el problema es esencialmente cuantas combinaciones de n sitios de fijación son posibles si tomamos i de ellos a un mismo tiempo.

Aplicando la ecuación (17) tenemos que hay $\frac{n!}{i!(n-i)!}$ formas diferentes del complejo PA_i . Cada una de estas formas λPA_i están presente en una concentración igual a cualquier otra forma de PA_i . Operaciones similares nos permiten llegar a la conclusión que hay $\frac{n!}{(i-1)![n-(i-1)]!}$ formas diferentes del complejo PA_{i-1} . Cada una de estas formas ∂PA_{i-1} están presentes en una concentración igual a cualquier otra forma de PA_{i-1} . Por lo tanto:

$$K_i = \frac{\frac{n!}{i!(n-i)!}}{\frac{n!}{(i-1)!(n-i+1)!}} \frac{(\lambda PA_i)}{(\partial PA_{i-1}) (A)}$$

$$\frac{(i-1)!(n-i+1)!}{i!(n-i)} K$$

$$= \frac{[(i-1)(i-2)\dots][n-i+1)(n-i)(n-i-1)\dots]}{[i(i-1)(i-2)\dots][n-i)(n-i-1)\dots]} K \quad (18)$$

o

$$K_1 = \frac{n-i+1}{i} K \quad (19)$$

Así nosotros tenemos una relación general entre la constante experimental K_1 para la formación de i ésimo complejo, PA_i y la constante de afinidad intrínseca K .

Ahora si sustituimos las ecuaciones (8-11) en la ecuación (2) tenemos:

$$r = \frac{K_1 [P] [A] + 2K_1 K_2 [P] [A]^2 + \dots + i(K_1 K_2 \dots K_i) [P] [A]^i + \dots}{[P] + K_1 [P] [A] + \dots + (K_1 K_2 \dots K_i) [P] [A]^i + \dots}$$

o

$$r = \frac{K_1 [A] + 2K_1 K_2 [A]^2 + \dots + i(K_1 K_2 \dots K_i) [A]^i + \dots + n(K_1 K_2 \dots K_n) [A]^n}{i + K_1 [A] + K_1 K_2 [A]^2 + \dots + (K_1 K_2 \dots K_i) [A]^i + \dots + (K_1 K_2 \dots K_n) [A]^n} \quad (20)$$

Si cada uno de los sitios tiene la misma afinidad intrínseca para A y además son independientes entre si, entonces las constantes individuales, K_1, K_2, \dots, K_n de la ecuación (20) pueden ser sustituidas por la ecuación (19).

$$r = \frac{nK[A] + \frac{2n(n-1)}{2!} K^2 [A]^2 + \dots + i \frac{n(n-1) \dots (n-i+1)}{i!} K^i [A]^i + \dots + \frac{n!}{n!} K^n [A]^n}{1 + nK[A] + \frac{n(n-1)}{2!} K^2 [A]^2 + \dots + \frac{n(n-1) \dots (n-i+1)}{i!} K^i [A]^i + \dots + \frac{n!}{n!} K^n [A]^n} \quad (21)$$

Refiriéndonos al teorema del binomio vemos que el denominador de la ecuación (21) es el desarrollo de

$$(1 + K [A])^n \quad (22)$$

Posteriormente si $[A]$ es factorizada en el numerador de la ecuación (21) obtenemos la derivada del denominador con respecto a $[A]$

$$\begin{aligned} \text{numerador} &= [A] \frac{\partial}{\partial [A]} \quad \text{denominador} = [A] \frac{\partial}{\partial [A]} (1 + K [A])^n \\ &= [A] nK (1 + K[A])^{n-1} \end{aligned} \quad (23)$$

Tomando en cuenta las relaciones en las ecuaciones (22) y (23) nosotros obtenemos:

$$r = \frac{[A] nK (1 + K[A])^{n-1}}{(1 + K[A])^n} \quad \delta \quad r = \frac{nK[A]}{1+K[A]} \quad (24)$$

rearrreglando términos:

$$\frac{1}{r} = \frac{1}{nK} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{n} \quad (25)$$

y

$$\frac{r}{[A]} = Kn - Kr \quad (26)$$

Las 2 últimas ecuaciones proporcionan una relación lineal que puede ser usada en la evaluación de las constantes n y K .

Sin embargo, cuando se hacen los trazos de Klotz y de Scatchard con datos experimentales es posible apreciar la existencia de dos tipos generales de desviaciones: negativas y positivas (Figura 1).

FIG. I

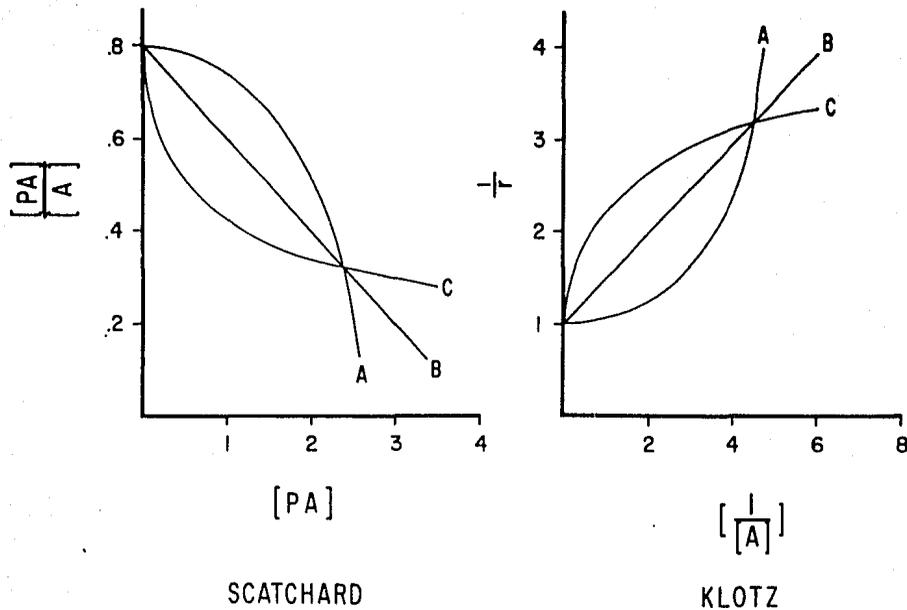


Figura 1. Desviaciones de los trazos de Scatchard y Klotz que pueden originarse por interacciones entre los sitios de fijación. El trazo A corresponde a interacciones positivas (cooperatividad) y el C a interacciones negativas y/o heterogeneidad inicial en los sitios de fijación. El trazo B corresponde a sitios idénticos y no-interaccionantes en el progreso de la reacción.

Las desviaciones se originan de interacciones durante el proceso de fijación o por heterogeneidad entre los sitios de fijación. La interacción entre los sitios de fijación en la misma macromolécula puede deberse a:

- a) Interferencia estérica entre moléculas enlazadas;
- b) interacciones electrostáticas originadas del incremento de carga sobre la macromolécula entre más ligando cargado enlaza;
- c) cambios conformacionales del anticuerpo por interacción con el ligando.

En un intento de suministrar una descripción cuantitativa de la heterogeneidad energética de los sitios de fijación Karush y Sonnenberg (64) propusieron una función de distribución tipo gaussiana donde K es una constante de equilibrio promedio correspondiente al máximo de esa distribución. Sips (65, 66) demostró que la ecuación que satisface la distribución se aproxima a la ecuación propuesta por Karush, y se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{r}{1-r} = (K [A])^a \quad (27)$$

en donde a es un índice de la desviación.

La ecuación 27 es posible linearizarla

$$\log \frac{r}{1-r} = a \log K + a \log [A] \quad (28)$$

Cuando a es igual a uno, la ecuación se reduce a la forma familiar para sitios idénticos no interaccionantes y, en general, cuando a es diferente a uno refleja la heterogeneidad de la población de sitios de fijación, generada en el transcurso de la reacción o ya existente en el sistema.

Así que para nuestros propósitos de estimar si alguna droga citotóxica se asocia a los anticuerpos nos interesa el número de sitios para esa droga en una población de anticuerpos ($[S_0]$) y su constante de afinidad (K). $[S_0]$ se calcula por la intercepción de $[P]/[L]$ en el eje de $[P]$ en el trazo de Scatchard (Ecuación 6) y K en la intercepción de la regresión de $\log r/l-r$ en $\log [A]$ de Sips (Ecuación 28).

APENDICE III

DIALISIS EN EQUILIBRIO

Este método está basado en la impermeabilidad de una membrana de diálisis (celulosa) a una macromolécula y a la difusión libre de un ligando (molécula pequeña) a través de la membrana.

En esencia, el método consiste en poner un volumen de proteína de concentración conocida en un compartimento separado de otro por medio de una membrana semipermeable y en el otro, un volumen de ligando de concentración conocida. Tanto la proteína como el ligando se encuentran en el mismo solvente.

Después del equilibrio se miden las concentraciones de ligando en ambos compartimentos, suponiendo que la concentración del ligando libre en el lado de la cámara que contiene la proteína es igual a la que se encuentra en la otra cámara que no tiene proteína.

El valor de la concentración en la cámara sin proteína representa el ligando libre en equilibrio y el valor en la otra cámara representa el ligando total, o sea, el que se ha pegado en la proteína y el que se encuentra libre.

La concentración molar de ligando libre la representamos por $[L]$ en la ecuación de Scatchard (Apéndice II) y la concentración molar de ligando pegado por $[P]$.

Una serie de estos pares de valores, es obtenida para un rango apropiado de ligando, entonces los datos pueden ser tratados de manera que su trazo nos

de una curva de fijación.

Puesto que las moléculas de proteína constituyen una especie cargada no difusible, la difusión de especies iónicas difusibles entre las cámaras está sujeta al efecto Donnan. En la práctica este efecto es reducido a un valor despreciable en soluciones isotónicas, las cuales son usadas normalmente en el manejo de anticuerpos. En general, una fuerza iónica de 0.1 es suficiente para hacer insignificante el efecto Donnan.

El tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio varía con la temperatura, la naturaleza del ligando y la distribución de éste entre las formas libres y pegadas. El tiempo mínimo en alcanzar el equilibrio puede ser determinado dializando soluciones de ligando contra el solvente y midiendo sus concentraciones en ambos lados de la membrana, en función del tiempo.

Periodos largos son generalmente convenientes para asegurar que se alcanzó el equilibrio.

Es necesario trabajar con bajas concentraciones de ligando porque las concentraciones usadas de proteína son pequeñas. Si la concentración de ligando excede grandemente a la concentración de proteína, la concentración de ligando pegado necesariamente será baja en relación a la concentración de ligando total y la diferencia de concentraciones en uno y otro lado de la membrana será pequeña para medirla con exactitud. Por lo anterior la concentración del ligando debe ser del mismo orden de magnitud o menor que la concentración de proteína. Por esta razón, para diálisis en equilibrio son generalmente usados ligandos radiactivos o que absorban fuertemente en la región

visible.

El método de diálisis en equilibrio está limitado para ligandos que sean suficientemente pequeños para difundir libremente a través de la membrana, también la proteína está sujeta a un límite determinado en cuanto a su tamaño.

APENDICE IV

DES NATURALIZACION REVERSIBLE DE ANTICUERPOS

Buscando aumentar el número de moléculas citotóxicas acarreadas por una molécula de anticuerpo se pensó desnaturalizar reversiblemente a ésta, en presencia del agente citotóxico. Se anticipaba que la desnaturalización reversible expondría una mayor área de interacción para la droga. Esto se basa en el cambio conformacional de la molécula de anticuerpo por la desnaturalización ocasionando que se establezcan mayor número de interacciones con otros grupos reactivos que antes estaban ocultos.

La desnaturalización se puede definir como cualquier modificación de la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína excluyendo cualquier rompimiento en su estructura primaria. Al desnaturalizarse la conformación de las moléculas se vuelve más extendida o abierta, semejando un proceso de desdoblamiento en el cual la estructura se vuelve desorganizada. Hay excepciones a lo anterior, pues algunas proteínas en estado desnaturalizado tienen conformación ordenada, pero para llegar a ésta han pasado por conformaciones desordenadas (67, 68).

Los principales estados desnaturalizados son:

- a) Enrollado al azar lineal, donde están rotas todas las interacciones interiores fijas no covalentes.
- b) Enrollado al azar con enlaces cruzados de disulfuro, en este estado desnatu-

realizado la proteína ha perdido toda su estructura no covalente mientras los enlaces disulfuro permanecen intactos.

- c) Estado incompletamente desordenado con estructura residual, es probable que aquí muchos grupos hidrofóbicos estén protegidos del contacto con el solvente en la región estructurada residual.
- d) Estado con alto contenido de hélice, posee una conformación ordenada pero totalmente diferente de la estructura nativa.
- e) Complejo con micelas de detergente, produciéndose en esta caso un estado solo parcialmente desordenado y las porciones ordenadas parecen capaces de formar estructuras micelares que contienen alta relación de detergente a cadena lateral de proteína.

Además de estos estados desnaturalizados hay muchos otros que son especiales de alguna proteína que pueden aparecer como productos estables en la desnaturalización con ácidos o álcalis o como estados intermedios estables o parcialmente estables en otros procesos de desnaturalización.

La desnaturalización de proteínas se puede llevar a cabo por medio de agentes físicos y químicos:

Agentes físicos. Uno de los más comunes es el calor, también por presión hidrostática alta, tratamiento mecánico, ondas ultrasónicas, envejecimiento, radiaciones, esparcimiento superficial formando capas monomoleculares insolubles.

Agentes químicos. pH, iones metálicos, muchos compuestos orgánicos, entre los más frecuentes están urea, clorhidrato de guanidina y detergentes ta-

les como alquilsulfatos y menos frecuentes los compuestos alifáticos, colorantes, enzimas y sustratos.

Una reacción de desnaturalización es claramente reversible si puede recuperarse la estructura nativa. La reversibilidad de la desnaturalización depende del tipo de proteína, del tratamiento de desnaturalización y del agente desnaturalizante. Siempre es difícil averiguar si la proteína nativa y la renaturalizada son idénticas, sin embargo, la desnaturalización de una proteína por un determinado agente desnaturalizante puede ser reversible o no de acuerdo al criterio de desnaturalización escogido. En la mayoría de los casos la desnaturalización es reversible solamente con referencia a ciertas propiedades.

Las inmunoglobulinas fueron las primeras proteínas oligoméricas que se utilizaron para regresarlas a su estado nativo después de desnaturalización hasta un estado completamente desordenado y con enlaces intercadena e intracadena rotos. Se han llevado a cabo muchos experimentos sobre desnaturalización reversible de inmunoglobulinas (67, 68 y 69). El procedimiento general que se ha utilizado para efectuar la desnaturalización hasta un enrollado al azar, y después la renaturalización ha sido el siguiente: después de obtener gammaglobulinas o de preparar anticuerpos específicos o fragmentos Fab purificados a los que se les ha determinado algunas propiedades como rotación óptica, velocidad de sedimentación, habilidad de combinación con el antígeno, etc. se procede a desdoblarlos con urea o con clorhidrato de guanidina. El criterio utilizado para determinar la magnitud del desdoblamiento ha sido en la mayoría de los experimentos efectuados medidas de dispersión óptica rotatoria,

estudios de equilibrio de sedimentación y pérdida de actividad biológica. La renaturalización se lleva a cabo por remoción lenta del agente desnaturizante por dilución y/o por diálisis. El material redoblado se prueba para demostrar la recuperación de sus propiedades nativas.

Karush (67) efectuó la desnaturización de moléculas de anticuerpo por acción de urea 8M, los anticuerpos regresaron a su forma globular por remoción de la urea por diálisis y recuperaron casi toda su actividad original (80-90%) pero el desdoblamiento no fue completo, pues urea 8M no es suficiente para desdoblamiento completo. Buckley y col. (70) encontraron que sólo el cloruro de guanidina hidratado es capaz de producir completo desdoblamiento de fragmentos Fab de anticuerpos anti-albúmina juzgándolo por medidas de rotación óptica y velocidad de sedimentación (Figura 2), la inversión del desdoblamiento se hizo por remoción lenta de la guanidina por diálisis recuperándose del 70-80% de su habilidad para combinarse con el antígeno. El clorhidrato de guanidina conduce a la ruptura de todos los enlaces no covalentes destruyendo la estructura secundaria, lo cual implica la destrucción inicial de la estructura terciaria llevando a las inmunoglobulinas hasta un estado de enrollado al azar sin estructura no covalente residual con enlaces cruzados disulfuro. Este estado transicional permitiría la exposición de residuos de aminoácidos antes ocultos siendo esto favorable para promover la interacción de drogas citotóxicas con estos residuos, intercambiándose con el agente desnaturizante durante su remoción, quedando la droga atrapada al recuperar la inmunoglobulina su estructura terciaria formándose de esta manera comple-

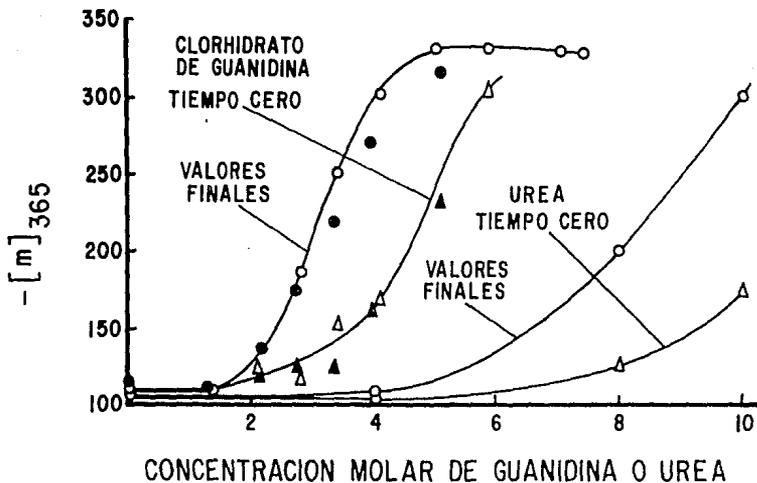


Figura 2. Desdoblamiento de fragmento I (Fab) no específico, medido por rotación óptica a concentración de proteína de 0.15-0.5 gm/100 cc, pH 5.5 y 15°C. Los círculos y triángulos abiertos representan datos obtenidos con fragmento I. Los círculos y triángulos llenos se obtuvieron con Fragmento I totalmente desdoblado (a 5°C) y después redoblado por remoción lenta de la guanidina. Los datos correspondientes similares a 25°C. (Buckley et al. Biochem. 50:827-834, 1963).

jos de inclusión droga-anticuerpo. Otra manera de que se formen dichos complejos sería por cierto desdoblamiento de los anticuerpos al aplicarles calor y posterior colapsamiento por enfriado rápido a baja temperatura estando la droga presente. La desnaturalización térmica es una combinación de repulsiones coulombicas y vibraciones térmicas que causan un alargamiento inelástico de partes de la molécula de proteína. Las moléculas de agua tienen un papel importante en la desnaturalización térmica, la estructura de enlaces de hidrógeno de muchas proteínas tienen sólo estabilidad marginal en solución acuosa debido a las propiedades de enlace de hidrógeno del agua, esta ligera estabilidad puede destruirse por calentamiento, los enlaces de hidrógeno internos pueden ser reemplazados por enlaces de hidrógeno externos con el agua y esto sugiere que si está presente una droga citotóxica con posibilidad de interaccionar por puentes de hidrógeno debido a su estructura química también podrá reemplazar a estos enlaces de hidrógeno internos y que al recuperar la proteína su estabilidad nativa, algunas moléculas de droga quedarían atrapadas formando un complejo droga-anticuerpo.