J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 46, pp. 10-17, 2009

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ٤٦، صفحات ١٧-١٠، ١٣٨٧

نشاندارسازی، کنترل کیفی و پراکنش زیستی پادتن anti-CD20 با گالیوم-۶۷

امیررضا جلیلیان*[1]، لیلا میرصادقی[2]، علیرضا خرمی[1]، صدیقه مرادخانی[1]، بهنام ناصریان[1]، سعید دانشوری[1]، نامی شادانپور[1]، حسن قهرمان[1]، رضا حاجی‌حسینی[2]

۱- پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج- ایران
۲- گروه بیولوژی، دانشگاه پیام نور، ناحیه ۱۰، تهران ـ ایران

چکیده: در حال حاضر برخی پادتن‌های anti-CD20 به صورت ساده یا نشاندار شده با رادیوایزوتوپ‌ها در درمان لنفوم کاربرد دارند. به منظور تهیه فرم نشاندار رادیوایزوتوپی، مزدوج‌سازی پادتن به وسیله ماده دو عامله سنتز شده DOTA-NHS در آزمایشگاه نشاندارسازی مواد صورت گرفت. بررسی‌های کروماتوگرافی لایه نازک برای کنترل واکنش و در نهایت، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل برای جداکردن مواد اضافی با جرم مولکولی کمتر از پروتئین مزدوج انجام شد. رادیوایزوتوپ گالیوم-۶۷ به صورت $^{67}GaCl_3$ تولید شده در سیکلوترون کرج، برای نشاندارسازی کمپلکس حاصل بکار رفت و شرایط نشاندارسازی (از جمله دما، زمان و غلظت مواد) بهینه شدند. کنترل کیفی به وسیله کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل و لایه نازک انجام گرفت. خلوص رادیوشیمیایی در حدود ۹۵٪ تعیین شد. ماده نشاندار برای بررسی پراکنش زیستی به مدت ۲۸ ساعت در موش صحرایی تجویز و پس از ۲۴ ساعت تجمع کمپلکس در سیستم رتیکولواندوتلیال مانند کبد و طحال دیده شد.

***واژه‌های کلیدی:** پادتن Anti-CD20، DOTA، گالیوم-۶۷، رینوکسیماب، سیکلوترون، کنترل کیفی، پراکنش زیستی، نشاندار کردن، تولید رادیوایزوتوپ*

Radiolabeling Quality Control and Biodistribution Study of Anti-CD20 Antibody by ^{67}Ga

A.R. Jalilian*[1], L. Mirsadeghi[2], A. Khorrami[1], S. Moradkhani[1], B. Naseriyan[1], S. Daneshvari[1], N. Shadanpour[1], H. Ghahraman[1], R. Haji-hosseini[2]

1- Agricultural, Medicine and Industrial Research school, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 31485-498, Karaj-Iran
2- Biology Department, Payam-e-Nour University, Region. 10, Tehran- Iran

Abstract: Nowadays, anti-CD20 antibodies are being used in the therapy of lymphomas in free or radiolabeled form. Conjugation process was performed using native antibody and DOTA-NHS compound, synthesized in our laboratory. Thin layer chromatography and gel filtration were used to control the reaction progress as well as purification of the final antibody conjugate. $^{67}GaCl_3$ produced at AMIRS was used to label the immunoconjugate and the reaction conditions were optimized for time, temperature and reactant concentrations. Quality control of the radioimmunoconjugate was performed using RTLC and gel filtration. The radiochemical purity was shown to be over 95%. The radioimmunoconjugate was used in the biodistribution studies up to 28 h and it was shown that after 24h most of the activity was accumulated in reticuloendothelial system consisting liver and spleen.

Keywords: ***Anti-CD20, DOTA, ^{67}Ga, Rituximab, Cyclotron, Quality Control, Biodistribution, Labeling, Radioisotope Production***

*email: ajalilian@nrcam.org

تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۹/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۱

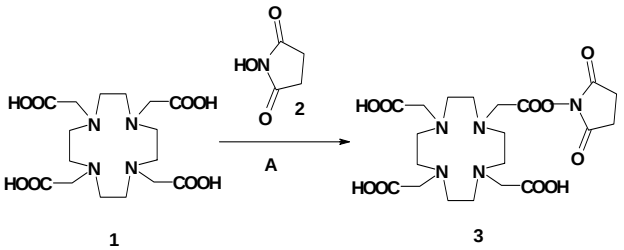
۱- مقدمه

Rituximab یک پادتن دوتایی انسانی- موشی است که تمایل زیادی برای اتصال به آنتی‌ژن CD20یا (human B-lymphocyte-restricted differentiation antigen, Bp35) دارد این آنتی‌ژن بیش از ۹۰ درصد در لنفومای نوع B یافت می‌شود و باعث تنظیم مراحل اولیه شروع چرخه سلولی و تمایز سلولی می‌گردد. این آنتی‌ژن نه از روی سلول‌های سرطانی جدا می‌شود و نه در فرایند اتصال آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به سلول داخل می‌گردد و بصورت آزاد هم در سرم یافت نمی‌شود. Rituximab بر روی سلول‌های لنفوما اتصال پیدا می‌کند و از طریق ایجاد کمپلکس باعث سمیت سلولی می‌شود. مطالعات زیادی در مورد استفاده از کونژوگه‌های نشاندار با ایزوتوپ‌های درمانی برای درمان انواع لنفوماهای سلول B انجام شده و تعداد دیگری در حال انجام هستند. مهمترین این ترکیبات ^{131}I-tositumomab (Bexxar) و ^{90}Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) می‌باشند که ۲۴ تا ۴۰ درصد درمان را طی دوره ۶ تا ۱۸ ماه برای این ترکیبات گزارش کرده‌اند. از طرفی طول بقای درمان نسبتاً طولانی در حدود ۵ سال را در بیماران گزارش کرده‌اند [۱ تا ۴]. در مواردی هم این پادتن در ایزوتوپ‌های تشخیصی مانند ید-۱۲۳ تولید شده و برای کاربردهای پراکنش زیستی بکار رفته است [۵].

برای نشاندارسازی پروتئین‌ها، پادتن‌ها و پپتیدها با رادیوایزوتوپ‌های فلزی از موادی مانند DOTA، DTPA استفاده می‌شود. به سبب پیشرفت‌های اخیر در علوم پروتئومیک و ژنومیک و تولید و کاربرد منوکلنال و پاره‌های آنها بسیاری از این زیست مولکول‌ها به این روش نشاندار شده و در تشخیص روندهای بیولژیکی به روش رادیوایمونوسنتی‌گرافی و رادیوایمونوتراپی بکار رفته‌اند.

این مواد دو عامله با توجه به سهولت تهیه و پایداری کمپلکس‌های حاصل اهمیت دارند، مثلاً در مورد DTPA پایداری نسبتاً مناسبی برای کمپلکس‌های ایندیوم آن درنظر گرفته می‌شود، حال آنکه کمپلکس‌های گالیوم آن چندان پایدار نیستند. از طرفی کمپلکس‌های حاوی گروه DOTA ترکیبات مزدوج حاوی رادیونوکلایدهای گالیوم و ایندیوم فراوانی هستند که همه آنها پایدارند. ماده کلیدی در این ساختارها DOTA-NHS می‌باشد که بنا به ناپایداری نسبی باید در جا تهیه و مورد استفاده قرار گیرد. ماده حاصل بصورت بالقوه با همه فلزات ۲ و ۳ ظرفیتی قابلیت نشاندارسازی دارد و در مطالعات پزشکی هسته‌ای بکار رفته است. برخی از این کونژوگه‌های نشاندار حاوی DOTA که در نشاندارسازی آنتی‌بادی‌ها، پروتئین‌ها و ... بکار رفته‌اند دارای عناصری مانند Ga-68, Ga-66, Ac-225, Lu-177, Pb-203 می‌باشند [۶ تا ۱۰]. همه این کمپلکس‌ها دارای پایداری قابل قبولی هستند. در این مطالعه نیز با توجه به اهمیت DOTA از این ترکیب دو عامله برای نشاندارسازی پادتن استفاده شد.

رادیوایزوتوپ‌های گالیوم همانند ایندیوم-۱۱۱ دارای ظرفیت ۳ بوده و فاقد فرمهای متنوع اکسیداسیون می‌باشند. برخی کمپلکس‌های فعال این رادیوایزوتوپ‌ها تهیه شده‌اند و در تشخیص بکار رفته‌اند. این عنصر در بدن بصورت همسان فضایی- زیستی یون آهن سه ظرفیتی عمل نموده و در صورت شکست ترکیبات این ایزوتوپ بر اساس چرخه یون فریک، جذب کبدی بالا می‌رود. مواد نشاندار با این رادیوایزوتوپ چندان متنوع نیستند با توجه به پایداری کمپلکس‌های گالیوم حاوی گروه DOTA برخی ترکیبات مزدوج حاوی رادیوگالیوم تهیه شده‌اند که ماده کلیدی در این ساختارها معمولاً DOTANHS می‌باشد که در این پژوهش روش سنتز آن گزارش شده است (شکل ۱). این ترکیبات مزدوج ممکن است متنوع باشند. خواص رادیونوکلایدهای مهم گالیوم و برخی کاربردهای آنها در جدول ۱ مندرج است.



شکل ۱- نمودار شمایی از روش تولید ترکیب DOTANHS، A: دی کلرومتان-DCC- دمای اتاق، ۱۸-۱۵ درجه.

جدول ۱- خواص فیزیکی و کاربردهای رادیوایزوتوپ‌های گالیوم.

رادیوایزوتوپ	نیمه‌عمر	مهمترین ترکیب نشاندار	کاربرد
گالیوم-۶۷	۷۸ ساعت	گالیوم سیترات	عفونتها، برخی سرطانها
گالیوم-۶۸	۶۸ دقیقه	^{68}Ga-DOTA-Octreotide	تومورهای منشا سوماتوستاتین
گالیوم-۶۶	۶ ساعت	^{66}Ga-DOTA-Octreotide, ^{66}Ga-antimyosin	تومورهای منشا سوماتوستاتین

یکی از رادیوایزوتوپ‌های مورد توجه در این تحقیق و استفاده روزمره در پزشکی هسته‌ای، گالیوم-۶۷ است که به دلیل نیمه‌عمر مناسب و سهولت تولید، یکی از بهترین گزینه‌های رادیوایزوتوپ فلزی می‌باشد. رادیوایزوتوپ گالیوم-۶۷ با استفاده از واکنش $^{68}Zn(p,2n)^{67}Ga$ در سیکلوترون قابل تولید است. رادیوداروی گالیوم سیترات در تشخیص برخی سرطان‌ها و عفونت‌ها و التهاب‌ها بکار می‌رود. به دلیل دسترسی به این رادیوایزوتوپ و سه ظرفیتی بودن آن برای نشاندارسازی مزدوج حاصل از DOTA و Rituximab بکار رفت تا از تولید این ماده مزدوج اطمینان حاصل شود و در مرحله بعدی مطالعه پراکنش زیستی ماده برای بررسی سرنوشت آن در محیط زنده انجام گردید. نتایج حاصل از این تحقیق ممکن است برای مطالعات آینده این مواد مزدوج مهم باشد.

۲- روش کار

کلیه مواد شیمیایی از کمپانی Aldrich تهیه شدند. کروماتوگرافی روی لایه نازک مواد غیرنشاندار، با استفاده از لایه سیلیکاژل روی پایه آلومینیومی (مدل F 1500/LS 254, 20×20cm, TLC Ready Foils Schleicher & Schuell) صورت گرفت. آکتیویته ویژه ماده نشاندار با استفاده از نمودار استاندارد حاصل از ماده سرد روی کروماتوگرام حساب شد. رادیوکروماتوگرافی روی یک موتور متحرک مجهز به آشکارساز ژرمانیوم فراخالص مدل (GC1020-7500 SL) با استفاده از لایه‌های سیلیکاژل روی پایه آلومینیوم صورت گرفت. کلیه شمارشها با استناد به پیک ۱۸۴ کیلوالکترون ولت انجام گرفت.

۲-۱ گالیوم-۶۷

تولید مرتب گالیوم-۶۷ برای مصرف پزشکی هسته‌ای کشور در پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی (NRCAM) در سیکلوترون ۳۰MeV انجام می‌گیرد. محلول آبی [^{67}Ga]- گالیوم کلراید حاصل از بمباران هدف جامد حاصل از الکتروپلیتینگ اکسید روی-۶۸ (غنی‌سازی شده به وسیله دستگاه جداکننده یونی واقع در پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی کرج) با انرژی حدود ۱۸ میلیون الکترون ولت بدست می‌آید. گالیوم-۶۷ دارای فتوپیک‌های اصلی (۲۴٪)۱۸۴ و (۴۰٪)۹۳ و (۲۲٪)۲۹۶ و (۷٪)۳۷۸ کیلوالکترون ولت و نیمه‌عمر ۷۸ ساعت است.

۲-۲ تهیه N-سوکسینیمیدیل-۱و۴و۷و۱۰-تتراآزاسیکلودودکان-۱و۴و۷و۱۰-تترااستیک اسید (DOTA-NHS)

تهیه این ترکیب، برطبق روش کلی تهیه ترکیبات استرهای سوکسینیمیدیل از اسیدهای مربوط و N-هیدروکسی‌سوکسینیمید انجام گرفت [۱۱]. برای یک بار نشاندارسازی مخلوطی از ۱و۴و۷و۱۰-تراآزاسیکلودودکان-۱و۴و۷و۱۰-تترااستیک اسید (۴ میلی‌گرم، ۰/۰۱ میلی‌مول)، دی سیکلوهگزیل کربودی ایمید (۲ میلی‌گرم، ۰/۰۱ میلی‌مول) و N-هیدروکسی سوکسینیمید (۱/۱۵ میلی‌گرم، ۰/۰۱ میلی‌مول) در دی‌کلرومتان خشک (۲۰۰-۳۰۰ میکرولیتر) درون یک لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتری تهیه گردید و تحت اتمسفر نیتروژن در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای ۱۵ ساعت بهم‌زده شد. روند واکنش، به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از فاز متحرک اتیل استات: هگزان (۱:۱، حجم در حجم) کنترل شد. تشکیل ماده منوسوکسینیمیدیل استر در R_f حدود ۰/۳۶ ملاحظه شد. مخلوط واکنش بلافاصله به وسیله باریکه‌ای از گاز ازت تغلیظ گردید و پس از تبخیر آن، لوله آزمایش به وسیله پارافیلم بخوبی پیچیده شده و در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد برای مرحله بعد نگهداری شد.

۲-۳ تهیه پادتن مزدوج شده با DOTA-NHS

ماده دو عامله DOTA-NHS تهیه شده با روش فوق برای مزدوج‌سازی با آنتی‌بادی بر اساس روش موجود در منابع با اندکی تغییرات بکار رفت [۱۲]. به لوله آزمایش حاوی ماده دو عامله فوق، ۰/۵ میلی‌لیتر از پادتن تجاری Rituximab® (با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) افزوده شده و به ملایمت در دمای اتاق به مدت ۳۰ ثانیه بهم‌زده شد، سپس ۱۵-۱۸ ساعت در همان دما به آرامی بهم‌زده شد و مخلوط حاصل به یک ستون فیلتراسیون ژل سفادکس G-50 با ابعاد ۲ در ۱۵ سانتی‌متر منتقل و با شویش با بافر فسفات، بخش‌های یک میلی‌لیتری از ستون استخراج شد. ۵۰ میکرولیتر از هر بخش یک میلی‌لیتری خروجی در حضور معرف فولین کولسیتو رنگ‌سنجی شدند و پررنگ‌ترین بخش برای نشاندارسازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد کنار گذاشته شد.

۲-۴ نشاندارسازی پروتئین مزدوج با گالیوم-۶۷ بفرم کلرید

این مرحله بر اساس روش کلی نشاندارسازی پروتئین‌ها با کمی تغییرات انجام گرفت [۱۳]. ظرف ۵ میلی‌لیتری ته مخروطی حاوی ۳۷-۴۰ مگابکرل کلرید گالیوم-۶۷ حل شده در محلول اسید استیک ۰/۲ مولار به آرامی در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تحت فشار ملایمی از گاز ازت خشک شد. سپس ظرف به دمای اتاق رسانده شد و پروتئین کونژوگه محلول در بافر فسفات با pH.8 به آن افزوده شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بهم خورد. کنترل کیفی به روش رادیوکروماتوگرافی روی غشای نازک با ۳ سیستم حلال انجام شد تا از تشکیل کمپلکس رادیوایمنی اطمینان حاصل شود. در صورت وجود گالیوم آزاد واکنش نداده محتویات واکنش با استفاده از کروماتوگرافی فیلتراسیول ژل توسط Sephadex G-50 column دارای حجم پرشده‌ای در حدود ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر مکعب خالص گردید و جمع‌آوری نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری از ستون با استفاده از شستشو بافر pH.8 انجام شد. نمونه‌ها در شمارنده رادیوآکتیویته (CRC-7, Capintec Instruments, Ramsey, NJ) شمارش شدند و با افزایش معرف تازه تهیه شده فولین (Folin-Colciteau® reagent) از نظر وجود پروتئین تحت بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دارای بیشینه رادیوآکتیویته که لزوماً دارای جذب مناسب پروتئین‌سنجی نیز بودند با هم مخلوط شدند و بر روی آنها کنترل کیفی به روش رادیوکروماتوگرافی روی غشای نازک با سیستم‌های حلال متنوع انجام شد تا از خلوص کمپلکس رادیوایمنی اطمینان حاصل شود. برای انجام تست‌های بیولوژیک، محلول نهایی از ستون Millex با منافذ ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. آزمایشهای کنترل کیفی (شامل کنترل رادیونوکلئیدی، رادیوشیمیایی، شیمیایی) روی محلول حاصل انجام شد.

۲-۵ کنترل کیفی ^{67}Ga-DOTA-rituximab

به منظور انجام کنترل کیفی، محلول رادیوآکتیو حاصل به روش کروماتوگرافی روی لایه نازک سیلیکاژل با حلال‌هایی به عنوان فاز متحرک، مورد بررسی قرار گرفت. خلوص رادیوشیمیایی با مقایسه رادیوپیک مولکول نشاندار ^{67}Ga-DOTA-rituximab نسبت به رادیوپیک یون گالیوم-۶۷ آزاد، یا کمپلکس ^{67}Ga-DOTA بررسی شد.

۲-۵-۱ کروماتوگرافی روی لایه نازک

یک نمونه ۵ میکرولیتری از محلول حاوی ^{67}Ga-DOTA-rituximab بر روی یک لایه کروماتوگرافی سیلیکا علامت‌گذاری شد و در محلول ۱۰٪ آمونیوم استات: متانول (۱:۱) قرار گرفت تا کروماتوگرافی انجام گیرد. مقایسه پیک موجود در پایه که به ^{67}Ga-DOTA-rituximab اختصاص دارد با پیک‌های مزاحم دیگر مبنای تشخیص خلوص رادیوشیمیایی می‌باشد [۱۴]. در روش دیگر از فاز متحرک محلول کلرور سدیوم ۰/۹٪ استفاده شد تا کروماتوگرافی انجام گیرد. مقایسه پیک موجود در پایه که به ^{67}Ga-DOTA-rituximab اختصاص دارد با پیک‌های مزاحم دیگر مبنای تشخیص خلوص رادیوشیمیایی می‌باشد [۱۱]. در نهایت، سیستم مخلوط حلال پیریدین: اتانول: آب (۱:۲:۴) نیز بکار رفت. مقایسه پیک موجود در پایه که به ^{67}Ga-DOTA-rituximab اختصاص دارد با پیک‌های مزاحم دیگر مبنای تشخیص خلوص رادیوشیمیایی می‌باشد. در این سیستم ^{67}Ga-DOTA به سوی بالای کاغذ حرکت می‌کند [۱۲].

۲-۵-۲ کروماتوگرافی روی کاغذ

یک نمونه ۵ میکرولیتری از محلول حاوی ^{67}Ga-DOTA-rituximab بر روی یک لایه کاغذ واتمن شماره ۱ علامت‌گذاری شد و در مخلوط حلال متانول: آب (۴۵:۵۵) قرار گرفت تا عمل کروماتوگرافی انجام گیرد. مقایسه پیک موجود در پایه که به ^{67}Ga-DOTA-rituximab اختصاص دارد با پیک‌های مزاحم دیگر مبنای تشخیص خلوص رادیوشیمیایی می‌باشد. در این سیستم ^{67}Ga-DOTA به بالای کاغذ حرکت می‌کند و در حدود ۹۵٪ رادیوآکتیویته در پایین کاغذ باقی می‌ماند که نمایشگر ^{67}Ga-DOTA-rituximab می‌باشد [۱۵].

۲-۵-۳ الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید

کونژوگه‌های رادیوایمن ^{67}Ga-DOTA-rituximab به منظور بررسی حفظ کامل پروتئین با استفاده از ژل پلی‌اکریلامید تحت عمل الکتروفورز قرار گرفتند (SDS-PAGE). پادتن نشاندار با و بدون افزودن ۲- مرکاپتواتانول آماده‌سازی شدند، سپس روی ژل قرار گرفتند و با استفاده از روش Laemmli تحت عمل قرار گرفتند [۱۶].

۲-۶ تجویز به موش‌های صحرایی برای مطالعات پراکندگی بافتی

۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رادیوآکتیو نهایی با آکتیویته حدود ۱۵۰-۱۰۰ میکروکوری از ناحیه وریدِ دُم به موش صحرایی تزریق شد. گروههای ۳ تایی موش‌ها در فواصل زمانی داده شده در جدول ۲ قربانی شدند و پس از اندازه‌گیری دقیق وزن هر بافت و آکتیویته موجود در آن در یک کنتور چاهی، آکتیویته اشباعی در بافت‌های اصلی به صورت درصد دوز جذبی در هر گرم بافت حساب شد.

۳- یافته‌ها و بحث

۳-۱ سنتز ماده کمپلکس‌کننده

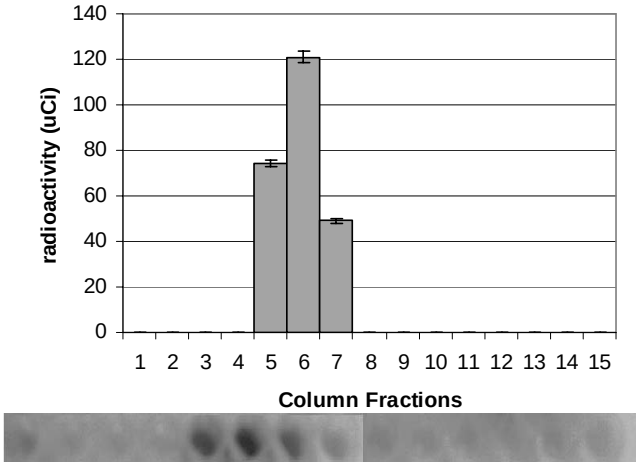
واکنش بین سوکسینیمیدیل‌ها و آمین‌های نوع اول از مهمترین واکنشهای انجام‌پذیر بین گروه‌های دو عامله و گروه لیزین پروتئین‌ها و پادتن‌ها است. یکی از مهمترین ترکیبات کمپلکس‌کننده فلزات ۲ و ۳ ظرفیتی گروه DOTA می‌باشد که بصورت تجارتی قابل تهیه است. برای تبدیل ماده کمپلکس‌کننده به گروه دو عامله DOTA-NHS بهترین واکنش، واکنش آبگیری در محیط حلال‌های آپروتیک، مانند دی متیل فرمامید (DMF) می‌باشد. در این پژوهش برای اولین بار از دی‌کلرومتان بطور موفقیت‌آمیزی برای این منظور استفاده شد. نکات مثبت استفاده از این حلال یکی قابلیت نگهداری طولانی بصورت خشک و دیگری نقطه جوش پایین آن نسبت به DMF می‌باشد. ماده آبگیر و مزدوج‌کننده نیز در اکثر این واکنش‌ها ماده دی‌سیکلوهگزیل کربودی ایمید (DCC) می‌باشد که باید ابتدا به روشهایی بطور مناسب عاری از آب و خالص گردد. معمولاً این واکنش‌ها کامل نیستند ولی با بازده حداقل ۶۰-۷۰ درصد قابل تهیه هستند. واکنش طی ۱۵-۱۸ ساعت در دمای اتاق و محیط بدون آب انجام می‌شود و ظهور رسوب معمولاً نمایشگر پیشرفت واکنش است. کروماتوگرافی لایه نازک بطور مناسبی روند واکنش را نشان می‌دهد. ماده حاصل ممکن است بطور مستقیم و بلافاصله پس از پایان مدت واکنش به‌وسیله خشک کردن محتویات واکنش تحت گاز ازت وارد واکنش مزدوج شدن با پروتئین گردد.

جدول ۲- داده‌های کروماتوگرافی ۵ نوع سیستم فاز متحرک و ۲ نوع فاز جامد مورد استفاده به منظور تعیین خلوص رادیوشیمیایی نمونه‌های پادتن نشاندار ^{67}Ga-DOTA-rituximab.

گونه شیمیایی	فاز ثابت	فاز متحرک	R_F
^{67}Ga-DOTA-rituximab	سیلیکاژل	در محلول ۱۰٪ آمونیوم استات : متانول (۱:۱)	۰/۰
$^{67}Ga^{3+}$	//	//	۰/۰
^{67}Ga-DOTA	//	//	۰/۳
^{67}Ga-DOTA-rituximab	//	کلرور سدیم ۰/۹٪	۰/۰
$^{67}Ga^{3+}$	//	//	۰/۱
^{67}Ga-DOTA	//	//	۰/۵
^{67}Ga-DOTA-rituximab	//	حلال پیریدین:اتانول: آب (۱:۲:۴)	۰/۰
$^{67}Ga^{3+}$	//	//	۰/۰
^{67}Ga-DOTA	//	//	۰/۹
^{67}Ga-DOTA-rituximab	واتمن	مخلوط حلال متانول:آب (۴۵:۵۵)	۰/۰
$^{67}Ga^{3+}$	//	//	۰/۸
^{67}Ga-DOTA	//	//	۰/۹
^{67}Ga-DOTA-rituximab	//	۰/۱ میلی مولار DTPA	۰/۰
$^{67}Ga^{3+}$	//	//	۰/۹
^{67}Ga-DOTA	//	//	۰/۹

۳-۲ نشاندارسازی

در هر نشاندارسازی، رادیوپیک پروتئین نشاندار ^{67}Ga-DOTA-rituximab در روی فازهای ثابت سیلیکا یا کاغذ واتمن در حدود R_f=۰-۰/۱ ظاهر می‌شود. در حالی‌که گالیوم به صورت کاتیونی و یا Ga-DOTA در سیستم‌های مختلف حلال در R_fهای گوناگون ظاهر می‌گردد. جدول ۲ داده‌های کروماتوگرافی ۵ نوع سیستم فاز متحرک و ۲ نوع فاز جامد مورد استفاده برای تشخیص موفقیت‌آمیز بودن نشاندارسازی در نمونه‌های پادتن نشاندار را نشان می‌دهد. برای خالص‌سازی، همچنین بررسی یکنواختی شستشوی پروتئین و یقین از نشاندارسازی مناسب بخش پروتئینی توسط رادیوایزوتوپ، اندازه‌گیری آکتیویته و مقدار پروتئین خروجی از ستون سفادکس انجام شد که در شکل ۲ نتایج آن مشاهده می‌شود. لازم به توضیح است که این داده‌ها به احتمال یقین برای بقیه ترکیبات نشاندار DOTA متصل به پروتئین‌ها و پادتن‌ها که با یونهای ۲ و ۳ ظرفیتی دیگر مانند ایندیوم-۱۱۱ و مس-۶۴ و ... نشاندار شده‌اند، نیز صادق است. مطالعات روی دیگر مزدوج‌های این رادیوفلزات در حال انجام می‌باشد.



شکل ۲- نمودار شویش پروتئین نشاندار از ستون فیلتراسیون ژل سفادکس G-50: بالا: شمارش رادیوآکتیویته نمونه‌های یک میلی‌لیتری ستون پایین: رنگ‌آمیزی فولین برای نمایش وجود پروتئین.

۳-۳ بررسی پایداری

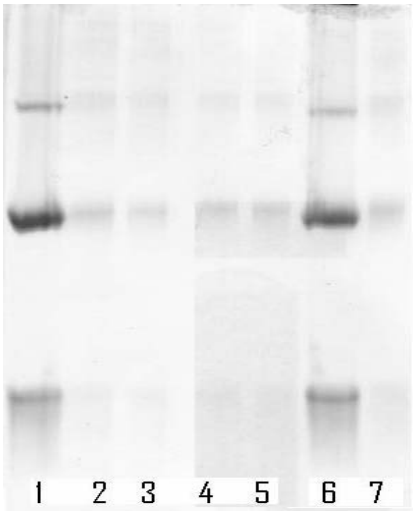
پس از گذشت ۱۲ ساعت، به روش‌های کروماتوگرافی بررسی‌هایی برروی محلول نهایی انجام شد که هیچگونه تغییری در خلوص رادیوشیمیایی محلول کمپلکس نشاندار شده مشاهده نگردید که نشان‌دهنده پایداری کمپلکس رادیوآکتیو حاصل است.

۳-۴ الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید

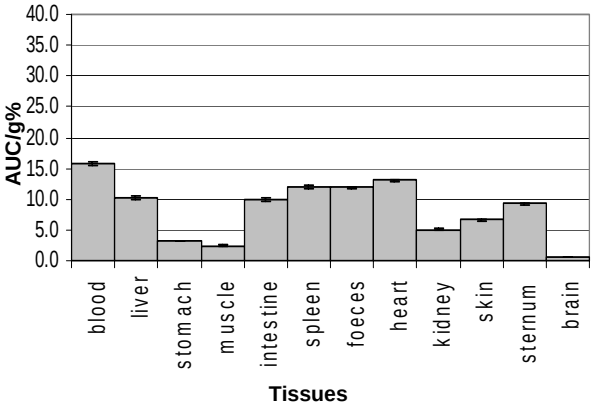
نتایج الکتروفورز برای ۵ نمونه نشاندار شده با گالیوم-۶۷، همچنین نمونه کونژوگه شده قبل از نشاندارسازی انجام شد. تفاوت محسوسی در الگوی شکست و یا رادیولیز برای نمونه‌های آزمایشی دیده نشد (شکل ۳).

۳-۵ بررسی پراکنش زیستی در موش‌های صحرایی سالم

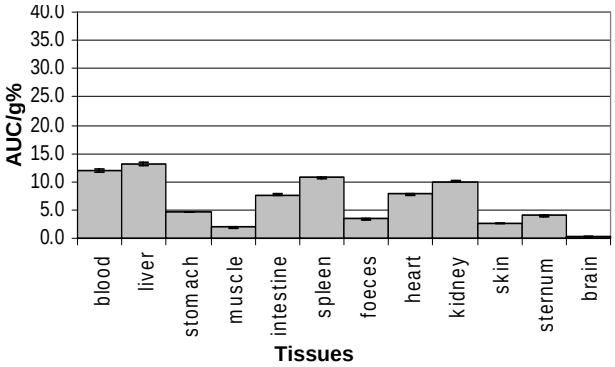
موش‌های صحرایی پس از تجویز رادیوآکتیویته، در زمان‌های ۲ و ۳ و ۲۴ و نهایتاً ۲۸ ساعت با بیهوشی به وسیله اتر قربانی شدند بلافاصله پس از مرگ، نمونه‌گیری خون از آئورت قلب انجام شد. سپس جداسازی بافت‌های قلب، طحال، کلیه، جگر، روده، معده، شش، پوست، مدفوع و مغز انجام شد. بافت‌ها بلافاصله با نرمال سالین شسته شده و روی کاغذ صافی خشک شدند. وزن دقیق هر بافت مشخص گردید و اندازه سطح زیر نمودار پیک ۱۸۴ کیلوالکترون ولت آنها توسط آشکارساز ژرمانیوم با خلوص بالا تعیین گردید. آکتیویته ویژه هر بافت بر اساس تقسیم سطح زیر نمودار هر بافت بخش بر وزن آن بافت بصورت نسبت درصد تعیین گردید (%AUC/g). شکل‌های ۴ تا ۷ نسبت درصد آکتیویته ویژه این ارگانها را نشان می‌دهند.



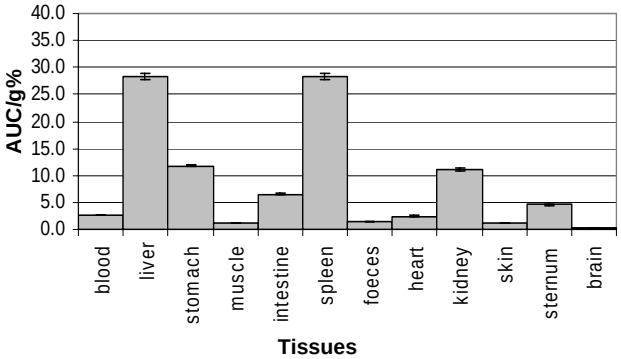
شکل ۳- نمایی از الگوی الکتروفورز SDSPAGE پادتن نمونه اولیه دارویی (۱) و نمونه‌های نشاندار شده با گالیوم-۶۷ (۲ تا ۵ و ۷) همچنین نمونه کونژوگه قبل از نشاندارسازی.



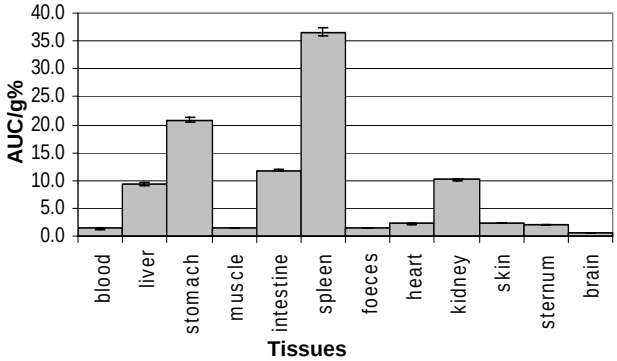
شکل ۴- پراکنش زیستی ^{67}Ga-DOTA-rituximab به فرم %AUC/g برای هر بافت در موش صحرایی نرمال پس از ۲ ساعت تجویز ۲۰ میکروکوری ماده رادیوآکتیو.



شکل ۵- پراکنش زیستی ^{67}Ga-DOTA-rituximab به فرم %AUC/g برای هر بافت در موش صحرایی نرمال پس از ۳ ساعت تجویز ۲۰ میکروکوری ماده رادیوآکتیو.



شکل ۶- پراکنش زیستی ^{67}Ga-DOTA-rituximab به فرم %AUC/g برای هر بافت در موش صحرایی نرمال پس از ۲۴ ساعت تجویز ۲۰ میکروکوری ماده رادیوآکتیو.



شکل ۷- پراکنش زیستی ^{67}Ga-DOTA-rituximab به فرم %AUC/g برای هر بافت در موش صحرایی نرمال پس از ۲۸ ساعت تجویز ۲۰ میکروکوری ماده رادیوآکتیو.

همانطور که در شکل‌های ۴ تا ۷ دیده می‌شود با گذشتن زمان افزایش نسبی رادیوآکتیویته در کبد و طحال دیده می‌شود. به طوری که می‌دانیم این پادتن که بر علیه آنتی‌ژن CD-20 می‌باشد اختصاصاً بر سطح سلول‌های لنفوسیت خون دیده می‌شود و از همین راه اثر سیتوتوکسیک و درمانی خود را ظاهر می‌سازد بنابراین منطقی به نظر می‌رسد که پراکنش آن پس از اتصال به سطح گلبول‌های سفید بر اساس الگوی سرنوشت این سلول‌ها استوار باشد. سلول‌های سفید اکثر دوره نهایی زندگی خود را در طحال سپری می‌کنند و در نهایت توسط سلول‌های کشنده طبیعی موسوم به Natural killers cells از بین می‌روند. روند مرگ سلول‌های سفید توسط اتصال آنتی‌ژن-پادتن و ایجاد سیستم مکمل پس از تجویز پادتن تسریع می‌گردد. بنابراین تجمع رادیوکمپلکس در طحال می‌تواند خود یک کنترل بیولوژیک غیرمستقیم برای این رادیوکمپلکس باشد. هرچند که تعیین دقیق فعالیت بیولوژیکی (ایمنورآکتیویتی) با روش‌های اتصال سلولی بر روی سلول‌های حاوی گیرنده CD-20 امکان‌پذیر است که در آینده انجام خواهد شد.

۴- نتیجه‌گیری

در شرایط بهینه، کل مراحل نشاندارسازی و خالص‌سازی [^{67}Ga]-DOTA-rituximab در حدود ۴ ساعت بطول انجامید. کمپلکس رادیوبیولوژیک حاصل با خلوص بیش از ۹۵٪ بدست آمد. پایداری آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حداقل تا ۲۴ ساعت بررسی شد و تفاوت معنی‌داری در این بازه زمانی در خلوص رادیوشیمیایی مشاهده نگردید. ماده نهایی به وسیله روش ژل الکتروفورز نیز تحت بررسی قرار گرفت و پایداری مناسب پروتئین در برابر ماده مزدوج‌کننده و رادیولیز ملاحظه شد. [^{67}Ga]-DOTA-rituximab ماده مناسبی برای بررسی‌های پراکنش زیستی و رادیوشیمیایی مزدوج DOTA-rituximab تلقی می‌گردد. در این پژوهش برای اولین بار در کشور نشاندارسازی پادتن مهم anti-CD20 معروف به Rituximab به وسیله روش ماده واسط DOTA انجام شد. با نشاندارسازی این مزدوج با ایزوتوپ‌های درمانی می‌توان رادیوداروهای نوین درمانی را ایجاد نمود. نشاندارسازی و کنترل کیفی این پادتن به وسیله رادیوایزوتوپ ایندیوم-۱۱۱ که پراکننده الکترون اوژه و از نوع رادیوایزوتوپ‌های درمانی می‌باشد، در حال انجام است.

References:

1. T.E. Witzig, C.A. White, G.A. Wiseman, L.I. Gordon, C. Emmanouilides, A. Raubitschek, N. Janakiraman, J. Gutheil, R.J. Schilder, S. Spies, D.H. Silverman, E. Parker, A.J. Grillo-Lopez, "Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma," J. Clin. Oncol. **17**, 3793–3803 (1999).

2. J.F. Eary, O.W. Press, C.C. Badger, L.D. Durack, K.Y. Richter, S.J. Addison, K.A. Krohn, D.R. Fisher, B.A. Porter, D.L. Williams DL, et al, "Imaging and treatment of B-cell lymphoma," J. Nucl. Med. **31**, 1257–1268 (1990).

3. S.J. Knox, R. Levy, R.A. Miller, W. Uhland, J. Schiele, W. Ruehl, R. Finston, P. Day-Lollini, M.L. Goris, "Determinants of the antitumor effect of radiolabeled monoclonal antibodies," Cancer Res. **50**, 4935-4940 (1990).

4. R.A. Kyle, M.A. Gertz, P.R. Greipp, T.E. Witzig, J.A. Lust, M.Q. Lacy, T.M. Therneau, "Long-term survival (10 years or more) in 30 patients with primary amyloidosis," Blood, **93(3)**, 1062-1066 (1999).

5. M. Dietlein, H. Pels, H. Schulz, O. Staak, P. Borchmann, K. Schomäcker, T. Fischer, W. Eschner, E.P. von Strandmann, H. Schicha, A. Engert, R. Schnell, "Imaging of central nervous system lymphomas with iodine-123 labeled rituximab," Eur. J. Haematol. **74**, 348-352 (2005).

6. J. Hoffend, W. Mier, J. Schuhmacher, K. Schmidt, A. Dimitrakopoulou-Strauss, L.G. Strauss, M.E.R. Kinscherf, U. Haberkorna, "Gallium-68-DOTA-albumin as a PET blood-pool marker: experimental evaluation in vivo," Nucl. Med. Biol. **32**, 287–292 (2005).

7. O. Ugur, P.J. Kothari, R.D. Finn, P. Zanzonico, S. Ruan, I. Guenther, H.R. Maecke, S.M. Larson, "Ga-66 labeled somatostatin analogue DOTA-DPhe1-Tyr3-octreotide as a potential agent for positron emission tomography imaging and receptor mediated internal radiotherapy of somatostatin receptor positive tumors," Nucl. Med. Biol. **29**, 147–157 (2002).

8. M.R. McDevitt, D.Ma,J. Simon, R.K. Frank, D.A. Scheinberg, "Design and synthesis of ^{225}Ac radioimmun opharmaceuticals," Applied Radiat. Isot. **57**, 841–847 (2002).

9. C.J. Smith, H. Gali, G.L. Sieckman, D.L. Hayes, N.K. Owen, D.G. Mazuru, W.A. Volkert, T.J. Hoffman, "Radiochemical investigations of ^{177}Lu-DOTA-8-Aoc-BBN[7-14] NH2: an in vitro/in vivo assessment of the targeting ability of this new radiopharmaceutical for PC-3 human prostate cancer cells," Nucl. Med. Biol. **30**, 101–109 (2003).

10. L.L. Chappell, E. Dadachova, D.E. Milenic, K. Garmestani, C.Wu, M.W. Brechbiel, "Synthesis, Characterization, and Evaluation of a Novel Bifunctional Chelating Agent for the Lead Isotopes ^{203}Pb and ^{212}Pb," Nucl. Med. & Biol. **27**, 93–100 (2000).

11. S. Banerjee, T. Das, S. Chakraborty, G. Samuel, A. Korde, S. Srivastava, M. Venkatesha, M.R.A. Pillai, "^{177}Lu-DOTA-lanreotide: A novel tracer as a targeted agent for tumor therapy," Nucl. Med. Biol. **31**, 753–759 (2004).

12. W. Mier, J. Hoffend, S. Kramer, J. Schuhmacher, W.E. Hull, M. Eisenhut, "Conjugation of DOTA using isolated phenolic active esters: The labeling and biodistribution of albumin as a blood-pool marker," Bioconjug. Chem. **16**, 237–240 (2005).

13. U. Pandey, A. Mukherjee, H.D. Sarma, T. Das, M.R.A. Pillai, M. Venkatesh, "Evaluation of ^{90}Y-DTPA and ^{90}Y-DOTA for potential application in intra-vascular radionuclide therapy," Appl. Rad. Isot. **57**, 313-318 (2002).

14. P. Goethals, M. Coene, G. Slegers, D. Vogelaers, J. Everaert, I. Lemahieu, F. Colardyn, G.R. Heyndrickx, "Production of carrier-free ^{66}Ga and labeling of antimyosin antibody for positron imaging of acute myocardial infarction," Eur. J. Nucl. Med. **16**, 237-240 (1990).

15. J. Kowalski, M. Henze, J. Schuhmacher, H.R. Macke, M. Hofmann, U. Haberkorn. "Evaluation of positron emission tomography imaging using [^{68}Ga]-DOTA-D Phe(1)-Tyr(3)-Octreotide in comparison to [^{111}In]-DTPAOC SPECT. First results in patients with neuroendocrine tumors," Mol. Imaging Biol. **5(1)**, 42-48 (2003).

16. U.K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4," Nature (London), **227**, 680–685 (1970).