

ZNAČENÍ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY ANTI-CD20 RADIOISOTOPY YTTRIA A LUTECIA

FRANTIŠEK BUDSKÝ, VLASTIMIL MILER
a ZDENĚK MÁLEK

Ústav jaderného výzkumu Řež, a.s., 250 68 Husinec - Řež,
č. p. 130
mlr@ujv.cz

Došlo 20.7.06, přepracováno 13.11.07, přijato 30.11.07.

Klíčová slova: monoklonální protilátka Anti-CD20, radioisotop ^{90}Y , radioisotop ^{177}Lu , diethylenetriaminpentaoctová kyselina, radioterapie, jaderný reaktor LVR-15

Úvod

První zprávu o značení protilátek radioisotopy podal v roce 1957 Pressman¹. Ke značení byly nejprve užívány radioisotopy jodu^{2,3} a aplikace souvisely především s rychlým rozvojem metod radioimunoanalýzy. Většina metod značení radiojodem je založená na principu elektrofilní adice nebo substituce na aromatickém kruhu. Tyto reakce sice probíhají snadno a s vysokým výtěžkem, ale jod tvoří ze všech halogenů nejslabší vazbu k aromatickému uhlíku (energie vazby pouze 250 kJ mol^{-1}). Pro aplikace *in vitro* je vazba jod–aromatický uhlík dostatečně pevná, ale při aplikaci *in vivo* dochází snadno k disociaci této vazby a tedy k rychlé dejodaci značeného imunoglobulinu.

Proto byly vyvinuty metody konjugace protilátek bifunkčními chelatačními činidly a konjugovanou protilátkou pak lze značit radioisotopem kovového charakteru^{4–6}. Bifunkční chelatační činidla totiž mají dvě funkční skupiny. Jedna, velmi reaktivní skupina, slouží k vytvoření vazby s protilátkou: konjugace protilátky. Druhá skupina, která se neúčastní konjugace, pak vytváří chelátovou vazbu s radioisotopem: značení konjugované protilátky. V současné době nabývají velkého významu cheláty radioisotopů trojvazných kovů zejména lanthanidů s konjugovanými protilátkami, protože je lze použít na cílenou terapii nádorových onemocnění. K lanthanidům totiž patří celá řada radioisotopů s fyzikálními vlastnostmi vhodnými pro terapii nádorových onemocnění. Konjugovaná protilátka označená vybraným radioisotopem s vysokou specifickou radioaktivitou pak může sloužit jako terapeutický radiofarmaceutický preparát, který je cíleně transportován do určité nádorové tkáně. Protilátka (mono- i polyklonální) má požadovanou specifitu k určitým antigenům nádorových buněk a korpuskulární záření přítomného radioisotopu pak má schopnost zabíjet nádorové buňky lineárním přenosem energie (LET – linear energy transfer).

Monoklonální protilátku Anti-CD20 značenou radioisotopem ^{90}Y resp. ^{177}Lu se specifickou radioaktivitou minimálně $600 \text{ MBq } ^{90}\text{Y mg}^{-1}$ resp. $400 \text{ MBq } ^{177}\text{Lu mg}^{-1}$ lze použít na léčbu ne Hodgkinského lymfomu (NHL)⁷.

Experimentální část

Chemikálie a zařízení

Katex AG 50W – X8, kyselina dusičná p.a., tetrahydrát citrátu lithného p.a., monohydrát citronové kyseliny p.a., hydroxid lithný p.a., chlorovodíková kyselina p.a., oxid yttritý p.a., chlorid lutecitý p.a., dimethylsulfoxid, dihydrogenfosforečnan sodný p.a., hydrogenfosforečnan disodný p.a., hydrogenuhlíčan sodný p.a., uhlíčan sodný p.a., diethylenetriaminpentaoctová kyselina p.a. (vše od Sigmy-Aldrich ČR).

Filtry mikrosep 10k (Pall, USA).

Chlorid lutecitý obohacený isotopem ^{176}Lu ze 64,3% (Isoflex, USA).

Radioisotopový generátor $^{90}\text{Sr} - ^{90}\text{Y}$, jaderný reaktor LVR-15 (ÚJV, Řež, a.s.).

Roztok protilátky CD20 v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,3) (Exbio, Praha ČR).

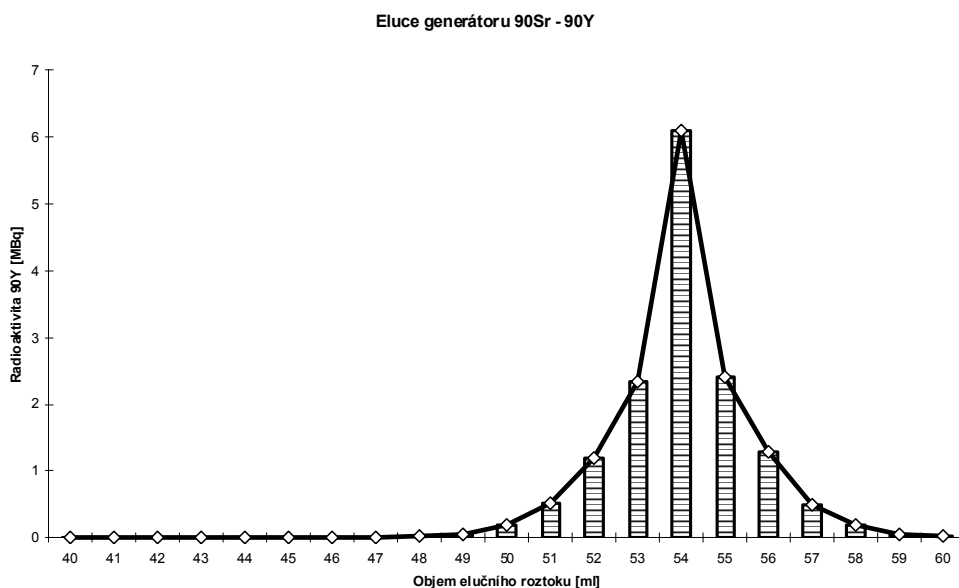
Příprava radioisotopu ^{90}Y

Radioisotop ^{90}Y podléhá přeměně β^- s poločasem $t_{1/2} = 64,1 \text{ h}$ za vzniku stabilního isotopu ^{90}Zr a lze ho připravit reakcí $^{89}\text{Y} (n, \gamma) ^{90}\text{Y}$, která má aktivací účinný průřez $\sigma = 1,3 \cdot 10^{-24} \text{ cm}^2$.

Nejvhodnější terčovou sloučeninou je oxid yttritý. Specifická radioaktivita, kterou lze dosáhnout ozařováním v reaktoru LVR-15, je však příliš nízká pro použití v radioterapii^{8,9}.

Pro přípravu ^{90}Y s vysokou specifickou radioaktivitou byl proto používán generátor na principu ionexové chromatografie na katexu AG 50W – X8. Na katex byl sorbován roztok radioisotopu ^{90}Sr (v rovnováze s ^{90}Y) v 0,5 M roztoku kyseliny dusičné, radioaktivita ^{90}Sr byla 15 MBq. Po sorpci byla kolona promyta vodou do neutrální reakce eluátu. Potom byla kolona promyta 0,1 M roztokem hydroxidu lithného do silně alkalické reakce a znovu vodou do neutrální reakce eluátu. Z takto připraveného generátoru bylo eluováno ^{90}Y po dobu 3 let v intervalu až 1× týdně. K eluci ^{90}Y byl používán roztok citrátu lithného o koncentraci $0,026 \text{ mol l}^{-1}$ (pH 5,50) připravený rozpuštěním 5,90 g tetrahydrátu citrátu lithného a 1,07 g monohydrátu citronové kyseliny v 1000 ml vody, pH bylo upraveno roztokem 0,1 M hydroxidu lithného resp. 0,1 M kyseliny chlorovodíkové, protože přesné udržení hodnoty pH ovlivňuje v podstatné míře kvalitu eluátu a životnost generátoru¹⁰.

Průběh eluce generátoru $^{90}\text{Sr} - ^{90}\text{Y}$ je znázorněn na obr. 1. Více než 99 % radioaktivity ^{90}Y bylo eluováno do frakce 46–55 ml a v této frakci tak byla objemová radioaktivita ^{90}Y $1,5 \text{ MBq ml}^{-1}$.

Obr. 1. Průběh eluce generátoru $^{90}\text{Sr} - ^{90}\text{Y}$, který je v provozu ÚJV ŘežPříprava radioisotopu ^{177}Lu

Radioisotop ^{177}Lu podléhá přeměně β^- s poločasem $t_{1/2} = 6,73$ d za vzniku stabilního isotopu ^{177}Hf a lze ho připravit reakcí¹¹:

Produkční reakce: $^{176}\text{Lu}(n, \gamma)^{177}\text{Lu}$, $\sigma = 1,77 \cdot 10^{-21} \text{ cm}^2$,

$t_{1/2} = 6,73$ d

Vedlejší reakce: $^{176}\text{Lu}(n, \gamma)^{177m}\text{Lu}$, $\sigma = 3,17 \cdot 10^{-22} \text{ cm}^2$,

$t_{1/2} = 160,4$ d

$^{175}\text{Lu}(n, \gamma)^{176m}\text{Lu}$, $\sigma = 1,6 \cdot 10^{-23} \text{ cm}^2$,

$t_{1/2} = 3,66$ h

Nejvhodnější terčovou sloučeninou je chlorid lutecitý s přírodním složením isotopů nebo obohacený isotopem ^{176}Lu . Jako terče byly použity:

– Terč A: chlorid lutecitý se složením terčových isotopů 35,7 % ^{175}Lu a 64,3 % ^{176}Lu .

– Terč B: chlorid lutecitý s přírodním složením isotopů tj. 97,4 % ^{175}Lu a 2,6 % ^{176}Lu .

Aktivace byla prováděna v křemenné ampuli o průměru 4 mm, tloušťce stěny 0,5 mm a výšce 60 mm. Jako vnější ozařovací schránka sloužila běžná úzká hliníková schránka užívaná pro zakládání do ozařovacího kanálu reaktoru LVR-15 o průměru 25 mm, tloušťce 1 mm a výšce 105 mm. Roztok ^{177}Lu byl připravován tak, že ozařené ampuli byla odříznuta horní část se zátavem a ampule byla vypláchnuta po částech 1–2 ml 0,026 M roztoku citrátu lithného, pH 5,5 (cit.¹²).

V reaktoru LVR-15 byly aktivovány celkem čtyři terče, jak je uvedeno v tabulce I.

Tabulka I

Přehled vzorků ^{177}Lu připravených aktivací v reaktoru LVR-15 v ozařovacím kanále H5 v poloze 2

Číslo vzorku	Terč	Navážka [mg]	Doba ozařování [h]	Celková dávka tepelných neutronů [cm^{-2}]	Radioaktivita ^{177}Lu [MBq]
1	A	0,01	24	$7,6 \cdot 10^{18}$	170
2	B	2	24	$7,6 \cdot 10^{18}$	1050
3	B	2	24	$7,6 \cdot 10^{18}$	1150
4	A	0,01	12	$3,8 \cdot 10^{18}$	70

Pozn.: terč A: chlorid lutecitý se složením terčových isotopů 35,7 % ^{175}Lu a 64,3 % ^{176}Lu ; terč B: chlorid lutecitý s přírodním složením isotopů tj. 97,4% ^{175}Lu a 2,6 % ^{176}Lu

Konjugace protilátky Anti-CD20

Ke konjugaci imunoglobulinů bylo navrženo a použito velké množství bifunkčních chelatačních činidel. Pro snadnou přístupnost a jednoduché provedení byla v ÚJV Řež zavedena metoda konjugace s dianhydridem diethylentriaminpentaoctové kyseliny (dále cDTPAA). Tento dianhydrid lze snadno připravit působením přebytku acetanhydridu v bezvodém prostředí za přítomnosti pyridinu na diethylentriaminpentaoctovou kyselinu (DTPA) při zvýšené teplotě¹³.

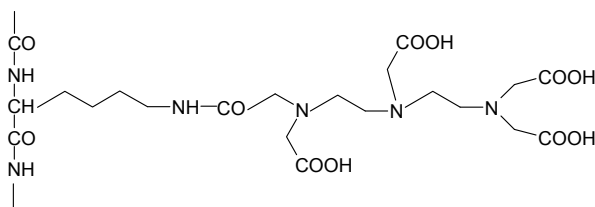
Konjugační reakce byly provedeny s nadbytkem cDTPAA ve vodném prostředí, přičemž jedna anhydridová skupina zreaguje s imunoglobulinem a druhá zhydrolyzuje zpět na karboxylové skupiny. Vazba chelatačního činidla k imunoglobulinu je zprostředkována volnou aminoskupinou bazických aminokyselin vázaných v peptidovém řetězci imunoglobulinu tj. zejména lysinem, případně hydroxylysinem nebo argininem. Chelatační činidlo je k peptidovému řetězci konjugováno amidovou vazbou, jak je uvedeno na příkladě lysinu na obr. 2.

Vyloučit nelze ani vazbu s volnou aminoskupinou koncové aminokyseliny popř. vazbu s volnou reaktivní skupinou SH imunoglobulinu. Zvláště vazba s volnou aminoskupinou koncové aminokyseliny by mohla vážně narušit imunoreaktivitu, neboť tyto volné aminoskupiny jsou právě ve variabilní oblasti protilátky. Mohou též vzniknout dimery, neboť cDTPAA obsahuje dvě reaktivní anhydridové skupiny.

Konjugační reakce byly prováděny nejprve v prostředí 0,1 mol l⁻¹ fosfátového pufru (pH 7,3) a později v 0,1 mol l⁻¹ karbonátovém pufru (pH 8,5), neboť při zvýšení pH reakční směsi se zvyšuje i výtěžek konjugace. Reakce probíhaly s velkým přebytkem cDTPAA rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Objem roztoku cDTPAA v DMSO přitom musí být maximálně 5 % objemu roztoku imunoglobulinu v příslušném pufru, protože vyšší přítomnost DMSO v reakční směsi by mohla poškodit imunoglobulin.

Konjugační reakce probíhaly za běžné laboratorní teploty po dobu 30 min za občasného promíchání reakční směsi. Při konjugační reakci se současně hydrolyzuje většina cDTPAA na DTPA resp. na její disodnou sůl DTPA-Na₂, která je ve vodném prostředí rozpustná.

Po konjugaci byla vysokomolekulární složka (tj. konjugovaný a nekonjugovaný imunoglobulin) oddělena



Obr. 2. Peptid konjugovaný s DTPA prostřednictvím 6-aminoskupiny lysinu

od nízkomolekulární složky (tj. roztok DTPA-Na₂ vzniklý konjugační reakcí) ultrafiltrací membránami MicroSep. Reakční směs byla nastříknuta na filtr MicroSep 10k a odstředěna. Vysokomolekulární složka, tj. konjugát protilátky Anti-CD20 s DTPA (DTPA_Anti-CD20), zůstal na filtru a roztok 0,1 mol l⁻¹ karbonátového pufru protekl filtrem. DTPA_Anti-CD20 byla z filtru vymyta roztokem 0,1 mol l⁻¹ fosfátového pufru. K vymytí bylo nutné použít co nejméně roztoku pufru, aby se příliš nezředila konjugovaná látka a bylo možné v tomto roztoku provést značení bez dalších úprav.

Příklad provedení konjugace

Roztok A: protilátka Anti-CD20 o koncentraci 1,6·10⁻⁵ mol l⁻¹ rozpuštěná v 0,1 mol l⁻¹ karbonátovém pufru (pH 8,5).

Roztok B: dianhydrid diethylentriaminpentaoctové kyseliny rozpuštěný v dimethylsulfoxidu o koncentraci 1,28·10⁻³ mol l⁻¹.

Ke 2 ml roztoku A bylo přidáno 0,1 ml roztoku B a směs byla za občasného promíchání ponechána reagovat po dobu 30 min. Po zreagování byla reakční směs podrobena ultrafiltraci a vysokomolekulární složka byla vymyta 2 ml 0,1 mol l⁻¹ fosfátového pufru. Koncentrace konjugované protilátky byla 1,6·10⁻⁵ mol l⁻¹, protože ultrafiltrace a rozpuštění proběhly kvantitativně.

Značení konjugované protilátky Anti-CD20

Značení konjugované protilátky CD20 bylo prováděno přidávkou roztoku příslušného radioisotopu k roztoku konjugovaného imunoglobulinu a to bezprostředně po separaci ultrafiltrací. Roztok radioisotopu musí mít pH > 5, protože při nižším pH by se poškodil imunoglobulin. Při tomto pH by se však roztoky radioisotopů hydrolyzovaly za tvorby radiokoloidů a tak bylo nutné pracovat s roztoky radioisotopů v přebytku slabého chelátotvorného činidla. Komplex musí být dostatečně pevný, aby se nehydrolyzoval a zároveň dostatečně slabý, aby byl radioisotop uvolněn pro vazbu s DTPA konjugovanou na protilátce Anti-CD20.

Ke značení byly použity radioisotopy ⁹⁰Y a ¹⁷⁷Lu rozpuštěné v 0,026 mol l⁻¹ citrátu lithném (pH 5,5). Konjugovaná Anti-CD20 označená radioisotopem byla opět z reakční směsi oddělena ultrafiltrací a vymyta 1 ml 0,1 mol l⁻¹ fosfátového pufru.

Příklad značení konjugátu radioisotopem ⁹⁰Y

Roztok C: 1,6·10⁻⁵ mol l⁻¹ protilátka Anti-CD20 konjugovaná s DTPA v 0,1 mol l⁻¹ fosfátovém pufru (pH 7,3).

Roztok D: eluát z generátoru ⁹⁰Sr – ⁹⁰Y o objemové radioaktivitě 1,5 MBq ⁹⁰Y ml⁻¹.

Roztok E: 3·10⁻³ mol l⁻¹ YCl₃ v 0,026 mol l⁻¹ citrátu lithném (pH 5,5).

K 1 ml roztoku D bylo přidáno 0,01 ml roztoku E a 0,1 ml roztoku C. Reakční směs byla za občasného promíchání ponechána reagovat 30 min, prodloužení doby

Tabulka II
Značení konjugované protilátky Anti-CD20 radioisotopem ^{90}Y

Koncentrace Y^{3+}	Koncentrace DTPA_Anti-CD20	Výtěžek značení	Radioaktivita	Stupeň konjugace
[mol l $^{-1}$]	[mol l $^{-1}$]	[%]	[MBq]	
$2,76 \cdot 10^{-5}$	$8,50 \cdot 10^{-6}$	84,9	1,27	2,81
$3,89 \cdot 10^{-5}$	$8,58 \cdot 10^{-6}$	68,1	1,02	3,12
$5,02 \cdot 10^{-5}$	$8,67 \cdot 10^{-6}$	52,2	0,71	2,95
			Průměr	$2,96 \pm 0,13$

Tabulka III
Značení konjugované protilátky Anti-CD 20 radioisotopem ^{177}Lu

Koncentrace Lu^{3+}	Koncentrace CD20-DTPA	Výtěžek značení	Radioaktivita	Stupeň konjugace
[mol l $^{-1}$]	[mol l $^{-1}$]	[%]	[MBq]	
$2,76 \cdot 10^{-5}$	$8,50 \cdot 10^{-6}$	83,1	0,997	2,71
$3,89 \cdot 10^{-5}$	$8,58 \cdot 10^{-6}$	66,9	0,803	3,02
$5,02 \cdot 10^{-5}$	$8,67 \cdot 10^{-6}$	50,2	0,602	2,90
			Průměr	$2,88 \pm 0,14$

reakce nemá na výtěžek žádný vliv. Značená protilátka byla z reakční směsi oddělena ultrafiltrací a vymyta 1 ml 0,1 mol l $^{-1}$ fosfátového pufru.

Výsledky a diskuse

Výtěžek značení byl vyhodnocen s použitím ultrafiltrace tak, že po označení byla stanovena radioaktivita nízkomolekulárního a vysokomolekulárního podílu.

Je-li A_v – radioaktivita vysokomolekulárního podílu, A_n – radioaktivita nízkomolekulárního podílu, V_y – výtěžek značení, pak $V_y(\%) = 100A_v / (A_v + A_n)$.

Stupeň konjugace tj. množství DTPA v molech na 1 mol protilátky Anti-CD20 byl stanoven metodou isotopového zředování tak, že ke značené látce byl přidáván nosič radioisotopu a následně byl stanoven pokles výtěžku značení. Aby výtěžek značení klesl, musí být koncentrace nosiče větší než koncentrace DTPA vázané na Anti-CD20. Tuto metodu lze použít, protože konstanty stability trojvazných kovů a DTPA jsou v rozmezí pK 22–28.

Je-li C_r – molární koncentrace radioisotopu, C_k – molární koncentrace konjugované CD20, S_k – stupeň konjugace tj. počet molů skupin DTPA vázaných na 1 mol imunoglobulinu, pak $S_k = V_y \cdot C_r / C_k$.

Dosažené hodnoty stupně konjugace a výtěžků značení radioisotopem ^{90}Y a ^{177}Lu jsou uvedeny v tabulkách II a III.

Závěr

Ověřené postupy konjugace a značení protilátky Anti-CD20 radioisotopy ^{90}Y a ^{177}Lu bude možné použít pro technologický vývoj vedoucí ke konstrukci soupravy radiofarmaka určeného k cílené radioterapii nehodkinského lymfomu.

LITERATURA

1. Pressman D.: Ann N. Y. Acad. Sci. 69, 644 (1957).
2. McFarlane A. S.: Nature 182, 53 (1958).
3. Hunter W. M., Greenwood F. C.: Nature (London) 194, 495 (1962).
4. Goodwin D. A. Q., Meares C. F., Diamanti C. I.: Nucl. Med. 14, 365 (1975).
5. Hnatowich D. J., Childs R. L., Lantaigne D., Najafi A.: J. Immunol. Methods 65, 147 (1983).
6. Budský F., Prokop J., Hradil M.: Jaderná Energie 35, 142 (1988).
7. Postema E. J., Oyen W. J. G., Boerman O. C., Corstens F. H. M.: J. Nucl. Med. 44, 853 (2003).
8. Budský F., Málek Z., Kysela J.: Výzkumná zpráva ÚJV Řež č. 11774, 2002.
9. Manual for Reactor Produced Radioisotopes, IAEA-TECDOC-1340, str. 244. IAEA, Vienna 2003.
10. Miler V., Budský F., Málek Z.: Výzkumná zpráva ÚJV Řež č. 11939, 2003.
11. Manual for Reactor Produced Radioisotopes, IAEA-

- TECDOC-1340, str. 121. IAEA, Vienna 2003.
12. Kysela J., Málek Z., Budský F., Miler V.: *Výzkumná zpráva ÚJV Řež č. 12275*, 2005.
 13. Budský F., Prokop J., Raban P., Šeblová J.: PV 4329/88/1988, AO 272584.
 14. Málek Z., Miler V., Budský F., Reková M., Kronrád L.: *Výzkumná zpráva ÚJV Řež č. 12240*, 2005.

F. Budský, V. Miler, and Z. Málek (*Nuclear Research Institute, Řež*): **The Labelling of Monoclonal Antibody Anti-CD20 with Yttrium and Lutetium Radionuclides**

This contribution presents a method of conjugation of monoclonal antibody CD20 with diethylenetriaminepentaacetic anhydride, the preparation of yttrium-90 and lutetium-177 radionuclides and the preparation of complexes of the antibody with the radionuclides. The complexes show high specific activities.





PSUP

METPOPULI

NÁRODNÍ PROGRAM VÝZKUMU II
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

NÁZEV PROJEKTU

Výzkum nových, moderních nástrojů a metod popularizace výsledků vědy, výzkumu a vývoje na vysokých školách v České republice ve spolupráci s vědeckou společností a způsoby jejich uplatňování v praxi

CÍLE PROJEKTU

- ↳ zhodnocení stávající situace v oblasti popularizace výsledků vědy, výzkumu a vývoje
- ↳ nalezení nových, moderních nástrojů popularizace výsledků vědy, výzkumu a vývoje, uplatnitelných v České republice

PŘÍJEMCI

Univerzita Palackého v Olomouci (www.upol.cz)
- Projektový servis UP (www.psup.cz)
Česká společnost chemická (www.csch.cz)

DOBA ŘEŠENÍ

31. 3. 2008 - 31.12. 2009

ZAMĚŘENÍ PROJEKTU

- ↳ analýza stávající situace v oblasti popularizace výsledků vědy výzkumu a vývoje na vysokých školách a vědecko - výzkumných institucí v České republice a ve vybraných státech EU (Velká Británie, Německo, Itálie, Francie, Belgie, Rakousko, Španělsko)
- ↳ komparace výsledků
- ↳ vytvoření metodiky popularizace výsledků vědy, výzkumu a vývoje na vysokých školách a vědecko - výzkumných institucích v České republice

Metody popularizace výsledků vědy, výzkumu a vývoje budou rozděleny do oblastí:

- 1) ZDRAVÍ
- 2) PŘÍRODNÍ VĚDY
- 3) SPOLEČENSKÉ VĚDY
- 4) NOVÉ TECHNOLOGIE A MATERIÁLY

Výstupy projektu budou zveřejněny na webových stránkách projektu www.metpopuli.cz

KONTAKT

Projektový servis UP | Šlechtitelů 27 | 783 71 Olomouc
tel.: 585 631 421 | fax: 585 631 401 | mobil: 774 401 559
e-mail: info@metpopuli.cz
www.metpopuli.cz