

ارزیابی سیتوکسیمب نشاندار با لوتسیم ۱۷۷ برای کاربردهای درمانی

کمال یآوری^{۱*}، محمد قنادی مراغه^۱

^۱ گروه رادیوشیمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران، ایران

*نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۱۸۲۰۶۴۳۵۶ فاکس: ۰۲۱۸۸۲۱۱۱۶ پست الکترونیک: kyavari@aeoi.org.ir

چکیده

زمینه و هدف: آنتی‌بادی منوکلونال سیتوکسیمب به گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال متصل می‌شود، بنابراین امکان ایجاد روش‌های تشخیصی و درمانی از طریق این گیرنده را فراهم می‌آورد. در این مطالعه قابلیت سیتوکسیمب جهت تولید یک رادیوداروی جدید مورد بررسی قرار گرفت و تست‌های کنترل کیفی آزمایشگاهی و حیوانی به عنوان گام اول در تولید رادیوداروی جدید انجام شدند.

روش کار: سیتوکسیمب با استفاده از اولترا فیلتر -۱۵ آمیکون دیالیز و تغلیظ گردید. پس از تخلیص، آنتی‌بادی از طریق شلاتور حلقوی دوکاره، DOTA-NHS، با لوتسیم ^{177}Lu نشاندار و با استفاده از ستون PD10 تخلیص گردید. خلوص رادیوشیمیایی و پایداری فراورده در بافر و سرم خون انسان با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک مشخص شدند. ژل الکتروفورز احیایی SDS-PAGE برای تایید ساختار آنتی بادی نشاندار با ایزوتوپ استفاده شد. مطالعات اولیه توزیع بیولوژیکی در موش‌های نرمال جهت تعیین توزیع کمپلکس رادیوایمنوگونزوگه به مدت ۷۲ ساعت انجام شد.

یافته ها: خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس $1 \pm 98\%$ بود. پایداری در بافر فسفات و در سرم انسان ۹۶ ساعت پس از تولید به ترتیب $2 \pm 96\%$ و $4 \pm 78\%$ بود. تمامی نمونه ها، کنترل ها و آنتی بادی نشاندار، در ژل الکتروفورز الگوی حرکتی مشابه نشان دادند. توزیع بیولوژیکی سیتوکسیمب- ^{177}Lu DOTA- در موش نرمال بررسی شد و بالاترین درصد رادیوآکتیویته دوز تزریق شده در هر گرم بافت (ID/g) در خون ($1.3 \pm 1/3\%$ در ۲۴ ساعت) و کبد ($9.1 \pm 1/3\%$ در ۲۴ ساعت) مشاهده گردید.

نتیجه گیری: نتایج ما نشان می‌دهد که DOTA-سیتوکسیمب می‌تواند ضمن حفظ ساختار خود، در پایداری قابل قبول با ^{177}Lu نشان دار شود. کمپلکس جدید می‌تواند برای ارزیابی بیشتر در حیوانات و احتمالاً به عنوان رادیوداروی جدید جهت رادیوایمنوتراپی سرطان ها در انسان در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: سیتوکسیمب؛ رادیوایمنوتراپی؛ ^{177}Lu ؛ DOTA-NHS.

دریافت: ۹۰/۴/۱۴ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۵

مقدمه

متصل می‌شود و بنابراین امکان ایجاد پروتکل‌های درمانی و تشخیصی علیه این گیرنده را فراهم می‌نماید. گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال یک پلی پپتید ۱۷۰ کیلودالتون بوده و از اعضای خانواده تیروزین کینازها است که در پرولیفراسیون، تمایز و بقای سلولی نقش حیاتی دارند [۱]. در سلول‌های نرمال، به ویژه سلول‌های با منشأ اپی‌تلیال، میزان بیان EGFR در محدوده ۴۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ گیرنده به ازای هر

درمان هدفمند از مهمترین روش‌های درمان سرطان است. گیرنده فاکتورهای رشد، دسته مهمی از هدف‌های درمانی را تشکیل می‌دهند. آنتی‌بادی منوکلونال سیتوکسیمب^۱ به گیرنده فاکتور رشد اپی‌درمال (EGFR)^۲ به عنوان گیرنده فاکتور رشد

^۱ Cetuximab (Erbix)

^۲ Epidermal Growth Factor Receptor

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

Yavari K, Ghannadi M. Lutetium 177-Labeled Cetuximab Evaluation for Radioimmunotherapeutic Applications. J Ardabil Univ Med Sci. 2012; 12(2): 204-212. (Full Text in Persian)

رادیو ایمنوکونژوگه تولید و آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی، کنترل کیفی در محیط آزمایشگاهی (In vitro) و داخل بدن حیوان (In vivo) به عنوان اولین قدم در تولید یک رادیوداروی جدید مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش کار

تولید ^{177}Lu : ^{177}Lu در راکتور تحقیقاتی تهران (قلب راکتور و بهترین موقعیت) با پرتودهی نوترونی (γ و n) اکسید لوتسیم $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ ، (خریداری شده از کمپانی TRACE آمریکا با درصد خلوص شیمیایی بیشتر از ۹۹٪) تولید شد. پس از پرتودهی کپسول $^{176}\text{Lu}_2\text{O}_3$ به مدت ۵ روز در جریان $1.0 \times 10^{13} \text{ n/Cm}^2$ به مدت ۳-۴ روز سرد شد و سپس در محلول HCl ۰/۲ مولار حل گردید.

تهیه آنتی بادی: محلول سیتوکسیمب (2 mg/mL) با استفاده از اولترافیلتر آمیکون (میلی پور، MWCO: ۳۰۰۰۰) شستشو شد. جهت نمک‌زدایی و تعویض بافر، محلول سه بار با بافر کونژوگه (بافر بیکرنات ۰/۲ میلی‌مول و $\text{pH}=9/2$) شستشو شد. غلظت نهایی آنتی بادی 10 mg/mL گردید.

تهیه کونژوگه سیتوکسیمب-DOTA-NHS: ^{177}Lu -DOTA-NHS (در نسبت مولی ۱۲۰) در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر بیکرنات حل گردید. سیتوکسیمب ($5 \text{ mg}/0.5 \text{ mL}$) در بافر بیکرنات به طور آهسته به محلول DOTA-NHS اضافه و به طور آرام به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق مخلوط گردید. واکنش کونژوگه‌سازی با اضافه کردن بافر آمونیوم استات (0.25 mL میلی‌مول و $\text{pH}=5/5$) و سپس سانتریفیوژ به اتمام رسید. کونژوگه حاصل با استفاده از همین بافر در ستون اولترافیلتر -۱۵، ۳ تا ۵ بار شستشو شد تا اینکه غلظت محلول فیلتر شده در بیوفتومتر در

سلول می‌باشد، در حالی که در سلول‌های سرطانی این میزان بیان 2×10^6 گیرنده به ازای هر سلول گزارش شده است [۲]. گیرنده در سرطان‌های پانکراس (۵۰-۳۰٪)، کولون (۷۷-۲۵٪)، سر و گردن (۱۰۰-۸۰٪)، ریه (۸۰-۴۰٪)، کلیه‌ها (۹۰-۵۰٪) و بسیاری از سرطان‌های دیگر بیان می‌شود. افزایش بیان EGFR با مهار آپوپتوز، پیشرفت چرخه سلول، رگ‌زایی، حرکت سلول و متاستاز همراه بوده و منجر به وخیم‌تر شدن فوتیپ بدخیمی و پیش‌آگهی بد بیماری می‌شود [۵-۲]. به همین دلایل، EGFR یک هدف جذاب و مهم در درمان‌های هدفمند محسوب می‌شود. استراتژی‌های به کار رفته علیه این گیرنده شامل مولکول‌های کوچک مهارکننده تیروزین کینازها و آنتی‌بادی‌های منوکلونال بوده است [۹-۶]. یکی از رویکردهای جدید روش رادیوایمنوتراپی می‌باشد و سیتوکسیمب میدان مطالعاتی یک سری از روش‌های تصویربرداری و کنترل بیماری، بیان EGFR، و انتخاب بیمار برای انجام محاسبات دزیمتری در درمان‌های رادیوایمنوتراپی بوده است.

اگر چه رادیونوکلیدهای مختلفی پتانسیل استفاده در رادیوایمنوتراپی را دارند، ولی با در نظر گرفتن خواص فیزیکوشیمیایی، هزینه‌های جانبی، نیمه عمر، دسترسی و تولید آسان مشاهده می‌شود که در مقایسه با ایزوتوپ‌هایی مثل ^{131}I و ایتريوم ^{90}Y ، ^{177}Lu از خواص درمانی و تشخیصی بهتری برخوردار است.

Perk و همکارانش در سال ۲۰۰۸ سیتوکسیمب را با ایزوتوپ‌های ایتريوم 90 ، زیرکونیم 89 و لوتسیم 177 نشاندار نموده و برخی خواص آنها را تحت یک سری شرایط مطالعه کردند [۱۱، ۱۰، ۷].

در این تحقیق لوتسیم-۱۷۷ به عنوان رادیونوکلید جهت نشاندارسازی سیتوکسیمب انتخاب گردید و سعی بر این شد که با بهینه کردن شرایط و به کارگیری شلاتور دیگر، سیتوکسیمب به صورت یک

¹ N-Succinimidyl-1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetra- Acetic acid

طول موج ۲۸۰ nm مساوی صفر گردید. ایمونوکونزوگه حاصل در ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

تعیین میانگین نسبت مولی شلاتور به آنتی بادی:

جهت تعیین تعداد گروه‌های شلاتور به ازای هر آنتی بادی روش اسپکتروفتومتری پی‌پین به کار رفت. تعداد شلاتور به ازای هر آنتی بادی توسط تیتراسیون کمپلکس Cu (II)-Aresenazo مشخص گردید [۱۲].

نشاندار سازی با رادیوایزوتوپ: ^{177}Lu کلراید

(۲-۳ mCi) در حجم ۱۰-۲۰ میکرولیتر HCl ۰/۲ مولار به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر آمونیوم استات اضافه شد، سپس کونزوگه سیتوکسیمب- DOTA-NHS (۱ mg) به آن اضافه و به آرامی مخلوط گردید. کمپلکس در ۴۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید و در آخر EDTA (۱۰ میلی‌مول، و در نسبت حجمی ۱ به ۹ حجم نمونه) به کمپلکس اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر در بن ماری انکوبه گردید. کمپلکس سیتوکسیمب- DOTA - ^{177}Lu NHS حاصل در ستون‌های ژل فیلتراسیون PD₁₀ توسط بافر PBS تخلیص شد.

آزمایشات کنترل کیفی

تولید و خلوص ^{177}Lu : خلوص رادیونوکلیدی ^{177}Lu با استفاده از اسپکتروفتومتر گاما $^1\text{HPGe}$ کنترل گردید.

خلوص رادیوشیمیایی: کارآرایی نشاندار سازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) 2 با استفاده از نوارهای واتمن شماره ۱ و بافر $^3\text{DTPA}$ (۱۰ میلی‌مول) به عنوان حلال ارزیابی گردید (شکل ۱).

پایداری سیتوکسیمب نشاندار با ^{177}Lu :

نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری از سرم خون تازه انسانی تهیه گردید. به هر کدام از نمونه‌ها ^{177}Lu ۱۰۰ μg / ۱۰۰ μCi

سیتوکسیمب- ^{177}Lu -DOTA اضافه کرده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پایداری نمونه‌ها در ساعت‌های ۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون، با استفاده از TLC مشخص گردید. برای بررسی پایداری فراورده در شرایط ۴ درجه سانتی‌گراد، دمای اتاق و بافر فسفات روش مشابه با سرم به کار رفت.

بررسی ساختار فراورده رادیوایمونوکونزوگه:

احتمال وقوع تغییرات ساختاری در سیتوکسیمب در اثر نشاندار سازی با ایزوتوپ با استفاده از SDS-PAGE بررسی گردید.

مطالعات توزیع بیولوژیکی: جهت بررسی توزیع

بیولوژیکی نرمال فراورده، ^{177}Lu ۱۰۰ μCi / ۱۰۰ μL از سیتوکسیمب- ^{177}Lu -DOTA یا ^{177}Lu Cl_3 به موش‌های نرمال با وزن ۲۵-۳۵ g از طریق ورید دم تزریق گردید. موش‌ها در ساعت‌های ۰، ۲، ۲۴، ۴۸، و ۷۲ پس از تزریق، بی‌هوش شده و از آنها خونگیری به عمل آمد. سپس بافت‌های مختلف آنها جدا شده و درصد رادیواکتیویته دوز تزریق شده به ازای هر گرم بافت (ID/g%) با استفاده از سیستم HPGe اندازه گیری گردید.

روش آماری: روش آماری به کار رفته در این مطالعه One Way ANOVA و نرم افزار SPSS.13 بود. در تمامی آزمایش‌ها مقادیر $p < ۰/۰۵$ به عنوان نتیجه یا تفاوت آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین انحراف معیار بیان گردیده است.

یافته‌ها

تولید ^{177}Lu : رادیونوکلید ^{177}Lu با فعالیت ویژه ۲-۳ mCi/ μg تولید شد و در بررسی خلوص رادیونوکلیدی آن به مدت چند روز با استفاده از سیستم آشکارساز HPGe، ناخالصی ثبت نگردید.

¹ High-Purity Germanium

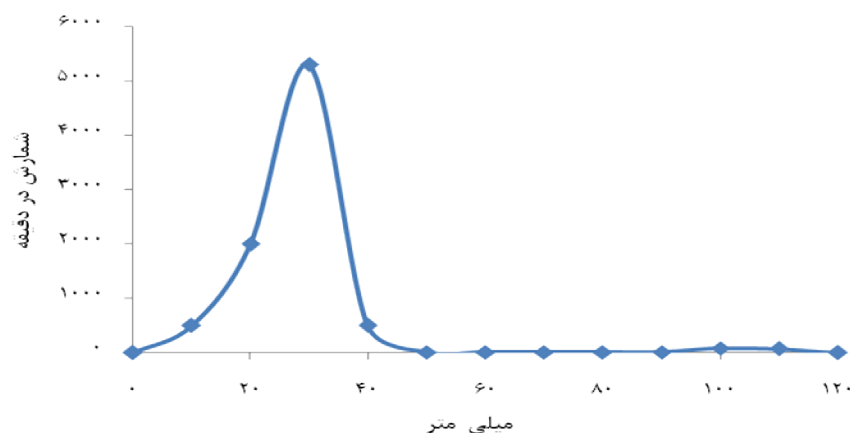
² Thin Layer Chromatography

³ Diethylenetriamine Penta-Acetic Acid

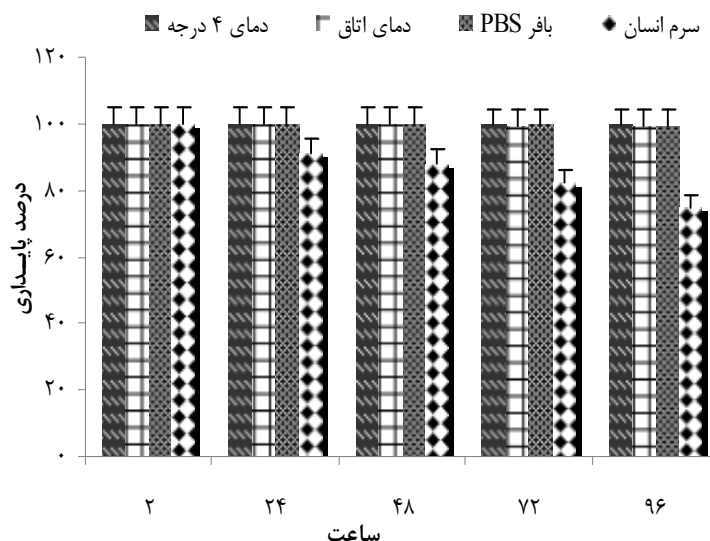
خلوص رادیوشیمیایی: خلوص رادیوشیمیایی به دست آمده در روش TLC نشان داد که بالاترین اکتیویته در قسمت پایین کاغذ قرار دارد (شکل ۱). خلوص رادیوشیمیایی فراورده یک ساعت پس از انکوباسیون، $98 \pm 1\%$ بدست آمد.

پایداری سیتوکسیمب- ^{177}Lu -DOTA: نتایج

فراورده تا ۹۶ ساعت پس از نشاندارسازی، بیش از ۹۷٪ پایداری داشت. پایداری فراورده در شرایط ذکر شده، تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p > 0.05$). همچنین پایداری نمونه در سرم خیلی خوب بود. به طوری که تا ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون تفاوت معنی‌داری در مقایسه با پایداری در دیگر شرایط



شکل ۱. خلوص رادیوشیمیایی فراورده با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک. شمارش‌ها از قطعات مختلف کاغذ ثبت شده است و بیشترین شمارش مربوط به سیتوکسیمب- ^{177}Lu -DOTA در محل لکه گذاری می‌باشد.



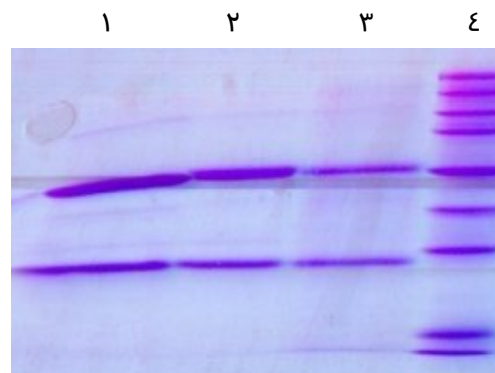
شکل ۲. پایداری In vitro سیتوکسیمب- ^{177}Lu -DOTA پس از نگهداری در شرایط مختلف

نشان نداد، هر چند که با گذشت زمان اندکی کاهش در پایداری آن مشاهده گردید ($p > 0.05$).

پایداری آن‌تیبادی نشاندار شده با انکوباسیون نمونه در دمای اتاق، ۴ درجه سانتی گراد، و بافر فسفات در زمان‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است.

آزمایش تایید ساختار سیتوکسیمب: نمونه‌ها

توسط SDS-PAGE آنالیز شدند. همانطوری که در شکل ۳ دیده می‌شود کونژوگه کردن و نشاندار کردن سیتوکسیمب با ایزوتوپ تغییری در ساختار مولکول سیتوکسیمب ایجاد نکرده است (شکل ۳).



شکل ۳. ژل الکتروفورز برای بررسی صحت ساختار سیتوکسیمب: ۱-سیتوکسیمب طبیعی ۲-کونژوگه سیتوکسیمب ۳- سیتوکسیمب ^{177}Lu -DOTA-NHS- ۴- سایز مارکر پروتئینی

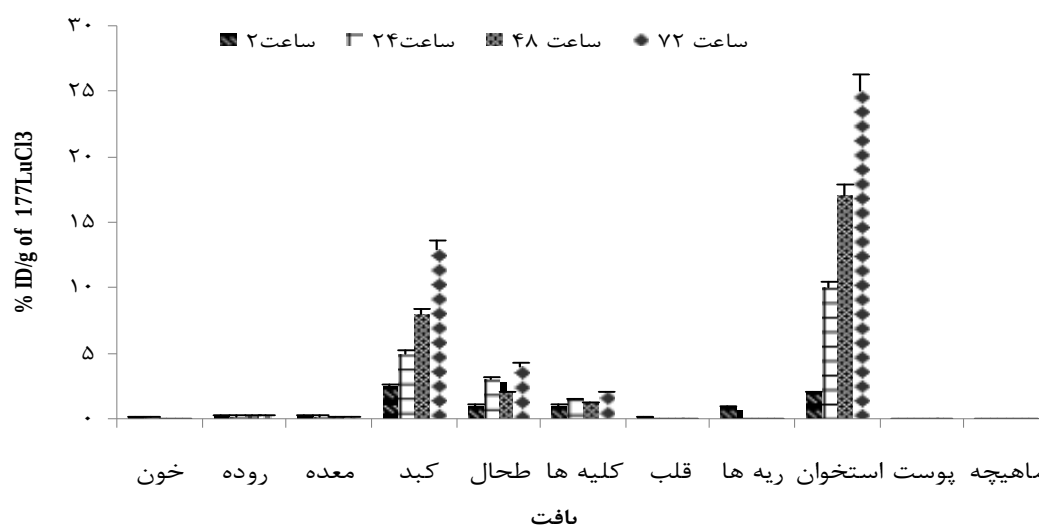
مطالعات توزیع بیولوژیکی: توزیع سیتوکسیمب

^{177}Lu -DOTA-NHS یا $^{177}\text{LuCl}_3$ در بافت‌های موش‌های نرمال مطالعه شد. در ساعت‌های مختلف پس از تزریق، از موش‌ها خونگیری به عمل آمد و

سپس اندام‌های آنها تشریح گردیدند. شکل ۴ توزیع بیولوژیکی $^{177}\text{LuCl}_3$ را نشان می‌دهد. بالاترین درصد برداشت $^{177}\text{LuCl}_3$ در استخوان و کبد مشاهده گردید و ارگان‌های دیگر نسبت به آنها برداشت قابل ملاحظه‌ای نداشتند ($p < 0.05$). شکل ۵ توزیع بیولوژیکی فراورده سیتوکسیمب -NHS- ^{177}Lu -DOTA را نشان می‌دهد. بالاترین ID/g% فراورده در خون (1.13 ± 0.13) و کبد (0.91 ± 0.13) در ۲۴ ساعت پس از تزریق مشاهده گردید ($p < 0.05$) و در مقایسه با این ارگان‌ها، سایر بافت‌ها برداشت قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند ($p > 0.05$).

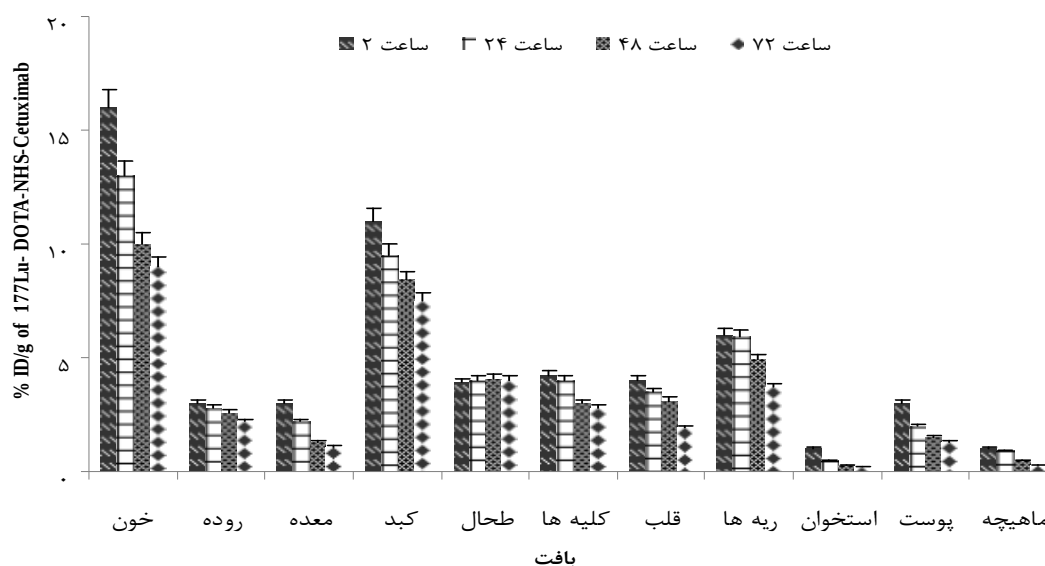
بحث

استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه گیرنده فاکتورهای رشد موضوع تحقیق بسیاری از گروه‌ها بوده است. به علاوه، بسیاری از این آنتی‌بادی‌ها در درمان‌های بالینی استفاده می‌شوند که از جمله آنها استفاده از هرسپتین (آنتی-ErbB-2)، اربیتوکس و کتامیکس (آنتی EGFR) برای درمان بیماران با بیماری متاستاز پیشرفته، مورد تایید واقع شده است.



شکل ۴. توزیع بافتی $^{177}\text{LuCl}_3$ در موش نرمال. مقادیر به صورت میانگین درصد دز تزریق شده به ازای هر گرم بافت می باشد ($\% \text{ID/g}$, $n=3$)

بنابراین مدارک زیادی جهت استفاده بالقوه چنین آنتی‌بادی‌هایی به عنوان حامل‌های ایزوتوپی و کل نشاندارسازی سیتوکسیمب-DOTA-NHS- ^{177}Lu در حدود ۱ ساعت طول کشید و خلوص



شکل ۵. توزیع بافتی سیتوکسیمب-DOTA- ^{177}Lu در موش نرمال. مقادیر به صورت میانگین درصد دوز رادیواکتیویته تزریق شده به ازای هر گرم بافت می باشد (n=3) (%ID/g)

رادیوشیمیایی فراورده $98 \pm 1\%$ بود.

توکسین وجود دارد [۹-۶].

کمپلکس سیتوکسیمب-DOTA-NHS- ^{177}Lu در شرایط مختلف از جمله سرم انسانی پایدار بود و خلوص رادیوشیمیایی بالایی داشت. این پایداری ممکن است نشان دهنده این باشد که ایزوتوپ آزاد وجود ندارد و این نتیجه، ذخیره آن را مناسب می‌سازد.

در این مطالعه، برای اولین بار، یک رادیوداروی جدید طراحی و کنترل کیفی شد. رادیونوکلید در راکتور تحقیقاتی تولید و در بررسی توسط سیستم HPGe ناخالصی مشاهده نشد. جهت نشاندارسازی، ابتدا سیتوکسیمب تخلیص و دیالیز شده و با DOTA-NHS کونژوگ گردید. جهت بهینه کردن نشاندارسازی، محدوده وسیعی از نسبت‌های غلظت مولار آنتی بادی به شلاتور مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس روش پی‌پین [۱۲] مشخص شد مولکول آنتی بادی در یک نسبت مولی ۱:۱/۳ به طور محکم به شلاتور چسبیده است. این نسبت مولی به دست آمده و اتصال محکم شلاتور، می‌تواند دلیلی بر بهینه بودن شرایط نشاندارسازی از قبیل انتخاب بافر مناسب، تخلیص بهتر آنتی‌بادی، و انتخاب مناسب دما، زمان و دیگر عوامل مؤثر بر کونژوگه‌سازی و نشاندارسازی باشد.

جهت مطالعه توزیع بیولوژیکی، فراورده نهایی همراه با لوتسیم آزاد به موش‌ها تزریق شدند و به مدت ۲ الی ۷۲ ساعت توزیع و برداشت آنها در بافت‌های مختلف موش‌ها مقایسه گردید. نتایج نشان دادند که $^{177}\text{LuCl}_3$ بیشتر در استخوان و کبد تجمع پیدا می‌کند که دلیل احتمالی این امر می‌تواند به ترتیب به خاطر مسیر تجمع و نفوذپذیری بالای آن در این اندام‌ها باشد. همچنین برداشت کبدی احتمالا به خاطر تجمع کاتیونی ^{177}Lu آزاد می‌باشد. اندام‌های دیگر برداشت واضحی نداشتند. در مقابل، مقدار زیادی از کمپلکس سیتوکسیمب-DOTA-NHS-

جای شلاتور DTPA در مطالعه مورد مقایسه باشد [۱۱].

در اکثر مطالعات (هم در مطالعه ما و هم در مطالعات مشابه انجام شده توسط دیگر محققان)، سیتوکسیمب توزیع بیولوژیکی بالایی را در خون نشان می‌دهد و فراورده رادیواکتیو از طریق مسیر کبدی متابولیزه می‌شود [۷، ۱۰، ۱۱].

نتیجه گیری

نشاندسازی سیتوکسیمب به منظور تولید رادیوداروی هدفمند از طریق شلاتور DOTA-NHS با ^{177}Lu در ساختار آنتی‌بادی اثری نداشته و می‌توان از روش مورد مطالعه برای تولید رادیوداروهای دیگر بر اساس ایمنی استفاده کرد. این مطالعه قابلیت سیتوکسیمب را به عنوان کونژوگه رادیواکتیو مفید جهت استفاده در درمان و تشخیص طیف وسیعی از سرطان‌ها و دیگر ناهنجاری‌های دارای افزایش بیان EGFR نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

بودجه این تحقیق از محل اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای به طرح مصوب ۸۹-۱۰ مورخ ۸۹/۹/۱۶ تامین گردیده است و از بابت حمایت مالی از پژوهشگاه فوق تشکر و قدردانی می‌شود.

^{177}Lu در خون باقی ماند. پس از خون، کبد بالاترین ID/g% ($9/1 \pm 1/3$) را داشت. برداشت قابل ملاحظه توسط کبد احتمالاً به خاطر مسیر دفعی سیتوکسیمب می‌باشد [۱۱، ۱۲].

همان طوری که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، برداشت فراورده در سایر بافت‌ها نسبت به کبد کمتر بوده و بیشترین میزان ID/g% ۲۴ ساعت پس از تزریق دیده می‌شود که با گذشت زمان به تدریج کاهش می‌یابد. برداشت کم کمپلکس توسط استخوان نشان می‌دهد که کمپلکس پایدار می‌باشد؛ چرا که لوتسیم آزاد در استخوان تجمع می‌یابد.

همان طوری که پیشتر ذکر گردید سیتوکسیمب با ایزوتوپ‌های مختلف نشانداز شده است. تعدادی مطالعات مشابه در این زمینه وجود دارد. مطالعات انجام گرفته توسط Perk و همکاران برای نشاندسازی سیتوکسیمب توسط ایتريوم-۹۰، زیر کونیوم-۸۹ نتایج تقریباً مشابهی را با نتایج مطالعه ما ارائه می‌نماید [۷، ۱۰، ۱۱].

از طرف دیگر مقایسه نتایج تحقیق ما با برخی مطالعات دیگر از جمله نتایج به دست آمده از مطالعه نشاندسازی سیتوکسیمب با ایندیم کلراید ۱۱۱، نشان می‌دهد که فراورده ما از پایداری بیشتری برخوردار است که دلایل احتمالی این اختلاف می‌تواند بیهنه بودن شرایط کار و همچنین به کارگیری شلاتور DOTA-NSH در مطالعه ما به

References

- 1- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. Crit Rev Oncol Hematol. 1995 Jul; 19(3):183-232.
- 2- Harding J, Burtneess B. Cetuximab: An epidermal growth factor receptor chemeric human-murine monoclonal antibody. Drugs Today. 2005 Feb; 41(2):107-127.
- 3- Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. Epidermal growth factor receptor biology (imcc225). Curr Opin Oncol. 2001 Nov; 13:506-513.
- 4-Herbst RS, Shin DM. Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: A new paradigm for cancer therapy. Cancer. 2002 Mar; 94:1593-1611.
- 5- Harari PM. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. Endocr Relat Cancer. 2004 Dec; 11(4):689-708.
- 6-Brenner TL, Adams VR. First MAb approved for treatment of metastatic breast cancer. J Am Pharm Assoc. 1999 Mar-Apr; 39(2): 236 -238.

- 7- Milenic DE, Wong KJ, Baidoo KK, Ray GL, Garmestani K, Williams M, et al. Cetuximab: Pre-clinical evaluation of a monoclonal antibody targeting EGFR for radioimmunodiagnostic and radioimmunotherapeutic applications. *Cancer Biother Radiopharm*. 2008 Oct; 23(5): 619–631.
- 8- Goldenberg DM. Advancing role of radiolabeled antibodies in the therapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2003 May; 52(5): 281- 296.
- 9- Rustamzadeh E, Low WC, Valleria DA, Hall WA. Immunotoxin therapy for CNS tumor. *J Neurooncol*. 2003 Aug-Sep; 64(1-2):101-16.
- 10- Rades D, Wolff C, Nadrowitz R, Breunig C, Schild SE, Baehre M, et al. Radioactive EGFR antibody cetuximab in multimodal cancer treatment: Stability and Synergistic effects with radiotherapy. *Int J Radiation Oncolo Biol Phys*. 2009 Nov; 75 (4): 1226-1231.
- 11- Perk LR, Visser GWM, Vosjan MJWD, Walsum MSL, Tijink BM, Leemans CR, et al. ⁸⁹Zr as a PET surrogate radioisotope for scouting biodistribution of the therapeutic radiometals ⁹⁰Y and ¹⁷⁷Lu in tumor-bearing nude mice after coupling to the internalizing antibody cetuximab. *J Nucl Med*. 2005 Nov; 46(11): 1898-1906.
- 12-Pippin CG, Parker TA, McMurry TJ, Brechbiel MW. Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates. *Bioconjugates Chem*. 1992 July; 3(4):342-345.

Lutetium 177-Labeled Cetuximab Evaluation for Radioimmunotherapeutic Applications

Yavari K^{*1}; Ghannadi M¹

¹Department of Radiochemistry, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Tehran, Iran.

* Corresponding Author. Tel: +982182064356 Fax: +982188221116 E-mail: kyavari@aeoi.org.ir

Received: 4 July 2011

Accepted: 15 January 2012

ABSTRACT

Background & Objectives: The monoclonal antibody cetuximab binds to EGFR and thus provides an opportunity to create both imaging and therapeutic modalities that target this receptor. The potential of cetuximab as a radioimmunoconjugate was investigated and quality control tests (in vitro and in vivo) were performed as a first step in the production of a new radiopharmaceutical.

Methods: Cetuximab solution was dialyzed and concentrated using an Amicon Ultra-15 filter. Purified antibody was labeled with lutetium-177 using the acyclic bifunctional chelator, DOTA-NHS, and radioimmunoconjugates were purified by PD10 columns. Radiochemical purity and stability in buffer and human blood serum were determined using thin layer chromatography. Integrity of the radiolabeled complex was checked by SDS-PAGE. Preliminary biodistribution studies in normal mice model performed to determine radioimmunoconjugates distribution up to 72h.

Results: The radiochemical purity of the complex was 98±1%. The stabilities in phosphate buffer and in human blood serum at 96 hours post-preparation were 96±2 % and 78±4%, respectively. All of the samples, controls and radiolabeled antibodies, showed a similar pattern of migration in the gel electrophoresis. Biodistribution of Lu¹⁷⁷-cetuximab was evaluated in normal mice and the highest ID/g% was observed in the blood (13.2±1.3% at 24 hours) and the liver (9.1±1.3% at 24 hours).

Conclusion: Our results show that DOTA-cituximab can be labeled with 177Lu. Lu177-cetuximab has sufficient stability and retains its integrity. The new complex could be considered for further evaluation in animals and possibly in humans as a new radiopharmaceutical for use in radioimmunotherapy of cancers.

Key words: Cetuximab; Radioimmunotherapy; ¹⁷⁷Lu; DOTA-NHS