



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

امیررضا جلیلیان*^۱، لیلا میرصادقی^۲، علیرضا خرمی^۱، صدیقه مرادخانی^۱، بهنام ناصریان^۱، سعید دانشوری^۱، نامی شادانپور^۱،
حسن قهرمان^۱، رضا حاجی حسینی^۲

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- ایران

چکیده: در حال حاضر برخی پادتن‌های anti-CD20 به صورت ساده یا نشانداری شده با رادیوایزوتوپ‌ها در درمان لنفوم کاربرد دارند. به منظور تهیه فرم نشانداری رادیوایزوتوپی، مزدوج‌سازی پادتن به وسیله ماده دو عامله سنتز شده DOTA-NHS در آزمایشگاه نشانداری مواد صورت گرفت. بررسی‌های کروماتوگرافی لایه نازک برای کنترل واکنش و در نهایت، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژل برای جدا کردن مواد اضافی با جرم مولکولی کمتر از پروتئین مزدوج انجام شد. رادیوایزوتوپ گالیوم-۶۷ به صورت $^{67}\text{GaCl}_3$ تولید شده در سیکلوترون کرج، برای نشانداری کمپلکس حاصل بکار رفت و شرایط نشانداری (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 نشانداری برای بررسی پراکنش زیستی به مدت ۲۸ ساعت در موش صحرایی تجویز و پس از ۲۴ ساعت تجمع کمپلکس در سیستم رتیکولاندوتلیال مانند کبد و طحال دیده شد.

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

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

A.R. Jalilian*¹, L. Mirsadeghi², A. Khorrami¹, S. Moradkhani¹, B. Naseriyan¹, S. Daneshvari¹,
N. Shadanpour¹, H. Ghahraman¹, R. Haji-hosseini²

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. $^{67}\text{GaCl}_3$ 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.

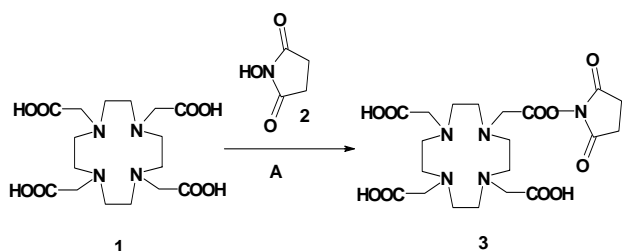
Keywords: *Anti-CD20, DOTA, ^{67}Ga , Rituximab, Cyclotron, Quality Control, Biodistribution, Labeling, Radioisotope Production*

*email: ajalilian@nrcam.org

۱- مقدمه

فلزات ۲ و ۳ ظرفیتی قابلیت نشاندارسازی دارد و در مطالعات پزشکی هسته‌ای بکار رفته است. برخی از این کوئزوگه‌های 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.

رادیویازوتوپ‌های گالیوم همانند ایندیوم-۱۱۱ دارای ظرفیت ۳ بوده و فاقد فرم‌های متنوع اکسیداسیون می‌باشند. برخی کمپلکس‌های فعال این رادیویازوتوپ‌ها 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 رادیویازوتوپ 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 رادیویازوتوپ‌های گالیوم.

کاربرد	مهمترین ترکیب نشاندار	نیمه عمر	رادیویازوتوپ
عقوتنها، برخی سرطانها	گالیوم سترات	۷۸ ساعت	گالیوم-۶۷
تومورهای منشا سوماتوستاتین	⁶⁸ Ga-DOTA-Octreotide	۶۸ دقیقه	گالیوم-۶۸
تومورهای منشا سوماتوستاتین	⁶⁶ Ga-DOTA-Octreotide, ⁶⁶ Ga-antimycin	۶ ساعت	گالیوم-۶۶

Rituximab یک پادتن دوتایی انسانی-موشی است که تمایل زیادی برای اتصال به آنتی‌ژن CD20 یا (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 کوئزوگه‌های نشاندار با ایزوتوپ‌های درمانی برای درمان انواع لنفوماهای سلول B انجام شده و تعداد دیگری در حال انجام هستند. مهمترین این ترکیبات ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) و ¹³¹I-tositumomab (Bexxar) 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 ۱۲۳-ید تولید شده و برای کاربردهای پراکنش زیستی بکار رفته است [۵].

برای نشاندارسازی پروتئین‌ها، پادتن‌ها و پپتیدها با رادیویازوتوپ‌های 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 بیولوژیکی به روش رادیوایمونوسنتی گرافی و رادیوایمونوترایی 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 در نظر 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 DOTANHS می‌باشد که بنا به ناپایداری نسبی باید در جا تهیه و مورد استفاده قرار گیرد. ماده حاصل بصورت بالقوه با همه



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 رادیو کروماتوگرافی 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 فیلتراسیون ژل توسط Sephadex G-50 column دارای حجم پر شده‌ای 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-Colcitateau® reagent) از نظر وجود پروتئین تحت بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دارای بیشینه رادیوآکتیویته که لزوماً دارای جذب مناسب پروتئین سنجی نیز بودند با هم مخلوط شدند و بر روی آنها کنترل کیفی به روش رادیو کروماتوگرافی 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 $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$

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 رادیویپیک مولکول نشاندار $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ نسبت به رادیویپیک یون گالیوم-۶۷ آزاد، یا کمپلکس $^{67}\text{Ga-DOTA}$ بررسی شد.

۲-۵-۱ کروماتوگرافی روی لایه نازک

یک نمونه ۵ میکرولیتری از محلول حاوی $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ بر روی یک لایه کروماتوگرافی سیلیکا علامت گذاری شد و در محلول ۱۰٪ آمونیوم استات: متانول (۱:۱) قرار گرفت تا کروماتوگرافی انجام گیرد. مقایسه پیک موجود در پایه که به $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ اختصاص دارد با پیک‌های مزاحم دیگر مبنای تشخیص خلوص رادیوشیمیایی می‌باشد [۱۴]. در روش دیگر از فاز متحرک محلول کلرور سدیم ۰/۹٪ استفاده شد تا کروماتوگرافی انجام گیرد. مقایسه پیک موجود در پایه که به $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ 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 $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ اختصاص دارد با پیک‌های مزاحم دیگر مبنای تشخیص خلوص رادیوشیمیایی می‌باشد. در این سیستم $^{67}\text{Ga-DOTA}$ به سوی بالای کاغذ حرکت می‌کند [۱۲].

۲-۵-۲ کروماتوگرافی روی کاغذ

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

۲-۵-۳ الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید

کونژوگه‌های رادیوایمن $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ به منظور بررسی حفظ کامل پروتئین با استفاده از ژل پلی‌آکریلامید 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].

آبگیری در محیط حلال‌های آپروتیک، مانند دی‌متیل‌فرمامید (DMF) می‌باشد. در این پژوهش برای اولین بار از دی‌کلرومتان بطور موفقیت آمیزی 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 دی‌سیکلوهاگزیل کربودی‌ایمید (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 به وسیله خشک کردن محتویات واکنش تحت گاز ازت وارد واکنش مزدوج شدن با پروتین گردد.

۳-۲ نشانداری

در هر نشانداری، رادیویسک پروتین نشانداری $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ در روی فازهای ثابت سیلیکا یا کاغذ واتمن در حدود ۰/۱-۰/۱ ظاهر می‌شود. در حالی که گالیوم به صورت کاتیونی و یا Ga-DOTA در سیستم‌های مختلف حلال در R_F ‌های گوناگون ظاهر می‌گردد. جدول ۲ داده‌های کروماتوگرافی ۵ نوع سیستم فاز متحرک و ۲ نوع فاز جامد مورد استفاده برای تشخیص موفقیت آمیز بودن نشانداری در نمونه‌های پادتن نشانداری را نشان می‌دهد. برای خالص‌سازی، همچنین بررسی یکنواختی شستشوی پروتین و یقین از نشانداری مناسب بخش پروتینی توسط رادیویزوتوپ، اندازه‌گیری آکتیویته و مقدار پروتین 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 نشانداری DOTA متصل به پروتین‌ها و پادتن‌ها که با یونهای ۲ و ۳ ظرفیتی دیگر مانند ایندیوم-۱۱۱ و مس-۶۴ و ... نشانداری شده‌اند، نیز صادق است. مطالعات روی دیگر مزدوج‌های این رادیوفلزات در حال انجام می‌باشد.

۲-۶ تجویز به موش‌های صحرایی برای مطالعات پراکنش بافتی ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رادیوآکتیو نهایی با آکتیویته حدود ۱۵۰-۱۰۰ میکروکوری از ناحیه ورید دم 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.

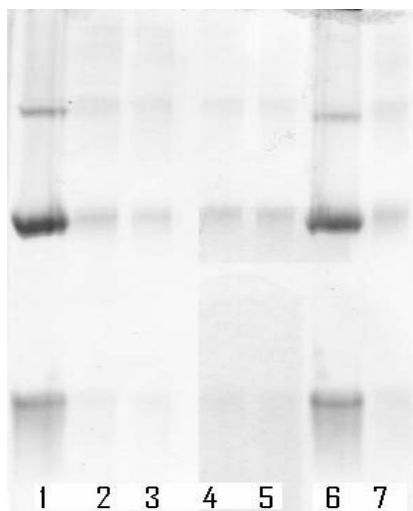
۳- یافته‌ها و بحث

۳-۱ سنتز ماده کمپلکس‌کننده

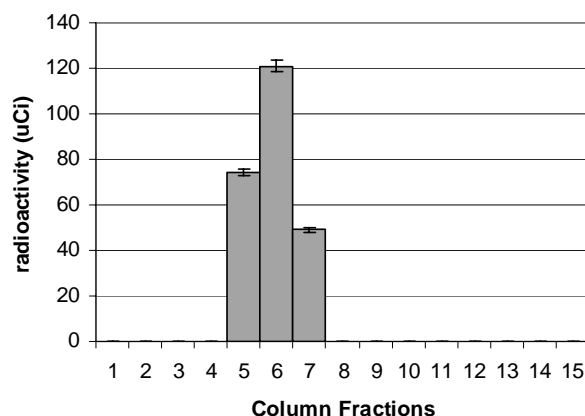
واکنش بین سوکسینیمیدیل‌ها و آمین‌های نوع اول از مهمترین واکنشهای انجام‌پذیر بین گروه‌های دو عامله و گروه لیزین پروتین‌ها و پادتن‌ها است. یکی از مهمترین ترکیبات کمپلکس‌کننده فلزات ۲ و ۳ ظرفیتی گروه DOTA می‌باشد که بصورت تجارتي قابل تهیه است. برای تبدیل ماده کمپلکس‌کننده به گروه دو عامله DOTA-NHS بهترین واکنش، واکنش

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

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



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



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

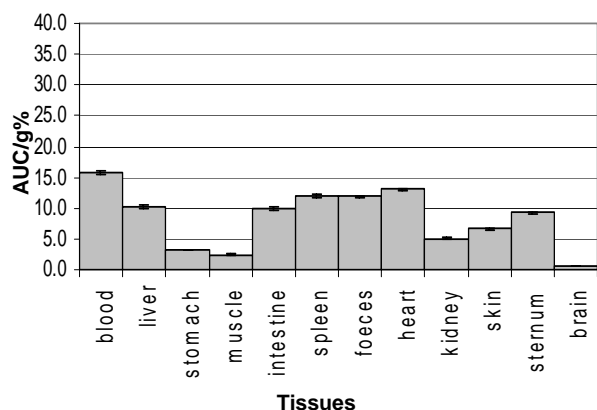
پس از گذشت ۱۲ ساعت، به روش‌های کروماتوگرافی بررسی‌هایی بر روی محلول نهایی انجام شد که هیچگونه تغییری در خلوص رادیوشیمیایی محلول کمپلکس نشاندار شده مشاهده نگردید که نشان‌دهنده پایداری کمپلکس رادیوآکتیو حاصل است.

۳-۴ الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکرلامید

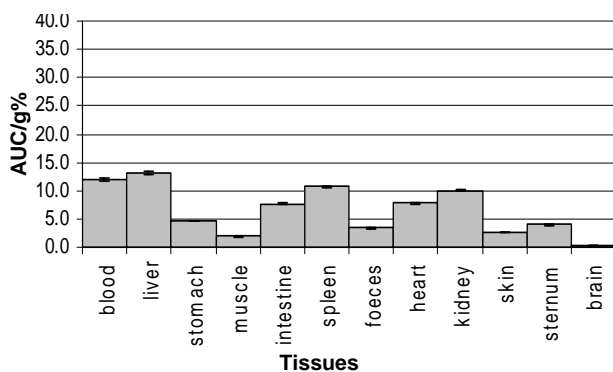
نتایج الکتروفورز برای ۵ نمونه نشاندار شده با گالیوم-۶۷، همچنین نمونه کونژوگه شده قبل از نشاندارسازی انجام شد. تفاوت محسوسی در الگوی شکست و یا رادیولیز برای نمونه‌های آزمایشی دیده نشد (شکل ۳).

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

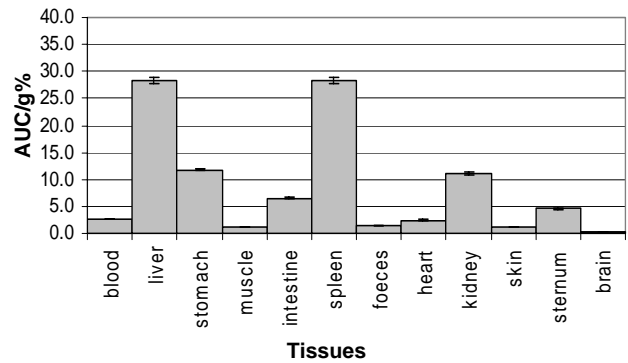


شکل ۵- پراکنش زیستی $^{67}\text{Ga-DOTA-rituximab}$ به فرم %AUC/g برای هر بافت در موش صحرایی نرمال پس از ۳ ساعت تجویز ۲۰ میکروکوری ماده رادیوآکتیو.

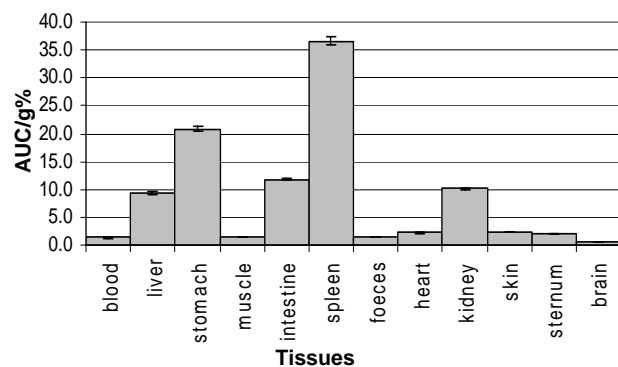
غیرمستقیم برای این رادیو کمپلکس باشد. هرچند که تعیین دقیق فعالیت بیولوژیکی (ایمنورآکتیویته) با روش‌های اتصال سلولی بر روی سلول‌های حاوی گیرنده CD-20 امکان‌پذیر است که در آینده انجام خواهد شد.

۴- نتیجه‌گیری

در شرایط بهینه، کل مراحل نشانداری و خالص‌سازی ^{67}Ga -DOTA-rituximab در حدود ۴ ساعت بطول انجامید. کمپلکس رادیو بیولوژیک 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. پراکنش زیستی و رادیوشیمیایی مزدوج DOTA-rituximab ^{67}Ga برای بررسی‌های تلقی می‌گردد. در این پژوهش برای اولین بار در کشور نشانداری پادتن مهم anti-CD20 معروف به Rituximab به وسیله روش ماده واسط DOTA انجام شد. با نشانداری این مزدوج با ایزوتوپ‌های درمانی می‌توان رادیوداروهای نوین درمانی را ایجاد نمود. نشانداری و کنترل کیفی این پادتن به وسیله رادیوایزوتوپ ایندیوم-۱۱۱ که پراکننده الکترون اوزه و از نوع رادیوایزوتوپ‌های درمانی می‌باشد، در حال انجام است.



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 رادیو کمپلکس در طحال می‌تواند خود یک کنترل بیولوژیک



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. Haberkorn, "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 radioimmunopharmaceuticals," *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).