تهیه و نحوه پراکنش Ga-DTPA-Rituximab در موش صحرایی نرمال

امیر رضا جلیلیان[۱] ، لیلا میرصادقی[۲*] ، رضا حاجی حسینی[۲]

بخش سیکلوترون وپزشکی هسته ای، مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته ای کرج، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، صندوق پستی ۴۳۹۵-۳۱۵۸۵ ،[۲] دپارتمان بیوشیمی ، دانشگاه پیام نور، واحد تهران

چکیده:

Rituximab با موفقیت به همراه گالیم کلراید[گالیم-۶۷] و DTPA تازه تهیه شده که ۲ مولکول آب از دست داده بود؛نشاندار شد(شکل ۱). بهترین نتایج پیوند زمانی حاصل شد که ml ۱ از محلول Rituximab دارویی (5mg/ml , دربافر فسفات pH=۸) به یک ویال شیشه ای که ابتدا با DTPA حلقوی بدون آب (۰/۰۱mg) پوشیده شده بود اضافه شد و در ۲۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ دقیقه به ملایمت تحت عمل مخلوط شدن(stir) قرار گرفت.RTLC (کروماتوگرافی لایه نازک رادیویی) خلوص رادیو شیمیایی کل را در شرایط بهینه (۹۹-۹۶) ٪ نشان داد.(اکتیویته ویژه= ۵۰۰MBq/mg -۳۰۰ ، ظرفیت نشاندارسازی=۷۷٪). کمپلکس های نهایی Ga-DTPA-Rituximab به وسیله ژل الکتروفورز برای کنترل شیمیایی/تجزیه دارویی چک شد.RTLC انجام شد تا تنها وجود یک گونه نهایی رادیواکتیو اثبات شود. همچنین مطالعات invivo (در سلول زنده) انجام شد تا نحوه پراکنش زیستی ترکیب رادیویی حاصل در مدل موش صحرایی نرمال تا ۶ ساعت پس از تزریق مشخص گردد.

واژه های کلیدی:

Rituximab / Radiolabeling (نشاندارسازی رادیویی)/ CD20 / DTPA /کنترل کیفی

مقدمه

Rituximab یک آنتی بادی منوکلونال کایمر موشی – انسانی است. این آنتی بادی با قدرت پیوندی بالایی به آنتی ژن CD20 (در لمفوسیتهای نوع B انسانی) متصل می شود؛ یک پروتئین قابل انتقال از غشاء با خاصیت هیدروفوب که روی لمفوسیتهای نوع B و در بیش از ۹۰٪ لمفوهای غیر هوجکینی بیان می گردد.CD20 نیز آنتی ژنی است که گام های نخستین پروسه فعال سازی چرخه سلولی و تمایز را تنظیم می نماید. CD20 تا اتصال آنتی بادی از سطح سلول جدا نشده و داخل نمی شود. تا کنون آنتی ژن آزاد CD20 در چرخه سلولی پیدا نشده است. اعتقاد بر این است که Rituximab برای تهی سازی و تخریب سلولهای CD20 مثبت ازطریق سایتوکاینهای سمی وابسته به آنتی بادی و کمپلمانهای تجزیه سلول عمل می کند. مطالعات گوناگونی در مورد آنتی بادی های منوکلونال ضد CD20 نشاندار با مواد رادیواکتیو در درمان لمفومای غیر هوجکینی (B-Cell NHL) گزارش شده و همچنان در حال پیشرفت است. مواردی که اطلاعات بیشتری در مورد آنها

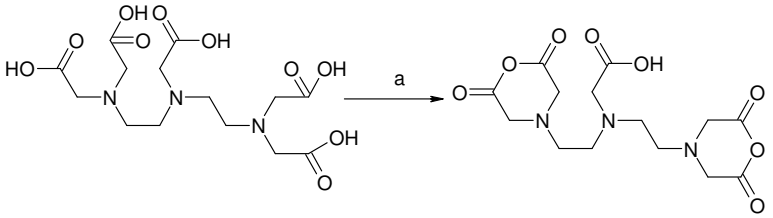
* lmirsa78@yahoo.com

موجـود اسـت ؛ tositumomab (Bexxar) [یـد-۱۳۱] و ibritumomab tiuxetan (Zevalin) [yttrium] است . این مطالعات میزان پاسخها را بین ۲۵٪ تا ۴۰٪ گزارش کرده انـد کـه بیـشتر، پاسـخهای متوسـطی در طول ۶ تا ۱۸ ماه و در برخی موارد نیز پاسخهایی پایدار تـا ۵ سـال گـزارش شـده اسـت [1-4] . بـه منظـور بدست آوردن یک ترکیب anti- CD20 برای استفاده در مطالعات درمانی رادیو ایزوتوپهـای مختلـف درمـانی استفاده می شوند؛ بدین منظور آنتی بادی نشاندار شده با گالیم به عنوان یک مدل بـه دام اندازنـده فلـز بـرای مطالعات مقدماتی پراکنش زیستی دزیمتری آماده شد. پایه این کار، آزمایشات اخیری بود که توسط گـروه مـا در آماده سازی آنتی بادی نشاندار شده با فلزات رادیواکتیو انجام شده بود [5] . نشاندار سازی با اسـتفاده از DTPA حلقوی که دو مولکول آب از دست داده بود به همراه غلظتهای مختلف Rituximab انجـام گرفـت . سرانجام یک روش نشاندار سازی رادیویی بهینه برای الحاق DTPA فعـال بـه anti- CD20 بمنظـور امکـان انجام مطالعات رادیو فلزی معرفی شد.

روش کار :

ترکیب DTPA حلقوی بدون آب با Rituximab:

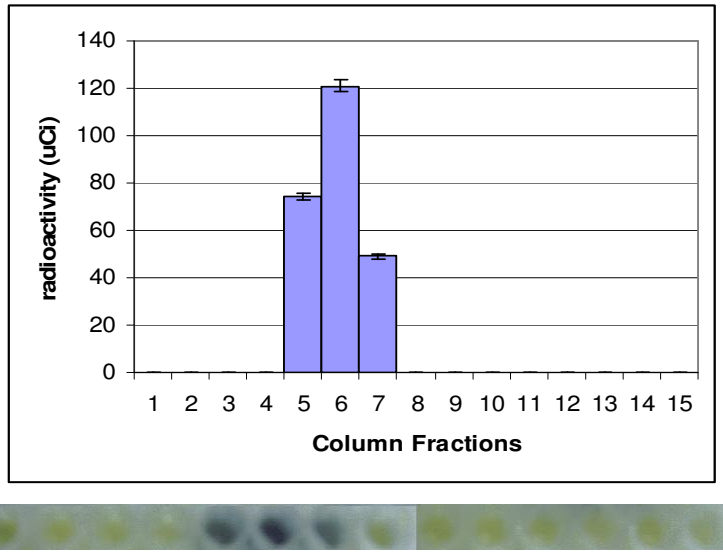
بوسیله تغییر کوچکی در روش مشهورcyclic anhydride دی اتیلن تری متیل پنتا استیک اسـید (DTPA) بـا آنتی بادی ترکیب شد [6]. نسبت مولی ۱:۱ در ایـن پیونـد رعایـت گردیـد بـه طـور خلاصـه ۲۰ میکرولیتـر شامل۱ mg/ml از سوسپانسیون DTPA بدون آب در کلروفرم حل شد و به یک ویال شیشه ای منتقل گردید. سپس کلروفرم تحت جریان ملایمی از گاز نیتروژن تبخیر شد. Rituximab (۵ میلی گرم در ۵/. میلـی لیتـر و۸ =pH) به طور پیوسته اضافه شد و به آرامی در دمای اتاق برای ۶۰ دقیقه عمل مخلوط شدن انجام گرفت . ترکیب حاصل از ستون سفادکس G-50 (۲ گـرم سـفادکس در ۵۰ میلـی لیتـر آب مقطـر وcm ۱۵×۲) رد شدو ۲۰ فر کشن که هرکدام ml ۱بود جمع آوری گردید سپس وجود پروتئین بـا اسـتفاده از جـذب UV در nm ۲۸۰ و یا روش رنگ سنجی folin- phenol چک شد. فرکشن حاوی بالاترین غلظت ترکیب مـورد نظـر انتخاب و در ۴ درجه سانتی گراد برای مرحله بعد نگهداری شد.



شکل ۱-دیاگرام شماتیک ساخته شدن DTPA حلقوی بدون آب

نشاندار سازی ترکیب DTPA - آنتی بادی همراه با گالیم-۶۷ :

ترکیب حاصل با استفاده از پروتکلی بهینه و مطابق با دستورالعملهای موجود در این زمینه نشاندار شد [7]. ۳۷ -۴۰MBq از گالیم کلراید (در Hcl 0.2M) به ویال شیشه ای اضافه شد و تحت جریان نیتروژن خشک گردید. فرکشن اصلی به ویال حاوی گالیم اضافه شد و به آرامی برای ۳۰ روز در دمای اتاق مخلوط شد. در ادامه ترکیب نشاندار شده DTPA – آنتی بادی از گالیم آزاد بوسیله کروماتوگرافی- فیلتراسیون ژل- روی ستون سفادکس G-50 (۱۵ تا ۲۰ میلی لیتر: حجم کل ماده) با PBS (بافر فسفات) شستشو و خالص شد. فرکشن های ۱ میلی لیتری جمع آوری و رادیو اکتیویته هر فرکشن بوسیله کالیبراتور دز رادیوایزوتوپها (CRC, capintec Instruments,Ramsey.NJ) اندازه گیری شد. اثبات وجود پروتئین با استفاده از روش رنگ سنجی فولین چک شد. در فرکشن های ۷-۵ وجود پروتئین اثبات شد که فرکشن ۶ در آزمایشات بعدی استفاده گردید(شکل ۲).فرکشن های حاوی پروتئین که ماکزیمم اکتیویته را نیز داشتند برای تعیین خلوص به کمک RTLC چک شدند. همچنین گالیم کلراید خالص و نیز DTPA-Ga هرکدام به طور جداگانه به عنوان آزمایشات کنترل کننده از ستون ژل-فیلتراسیون رد شدند.



شکل ۲-سنجش رادیو اکتیویته و رنگ سنجی فرکشنهای رادیو اکتیو حاوی پروتئین خارج شده از ستون کروماتوگرافی

کنترل کیفی Ga-DTPA-Rituximab:

a.کروماتوگرافی لایه نازک

سیستم**I** : ۵ میکرولیتر از فرکشن نهایی روی نوار سیلیکاژل لکه گذاری شد و در مخلوط آمونیوم استات ۱۰٪ : متانول (۹:۱) به عنوان فاز متحرک گذاشته شد.R_f گالیم آزاد و DTPA-Ga ۰/۹ و۰/۵، بود در حالیکه هنگامی که پروتئین نشاندارشده لکه گذاری شد در ابتدای نوار باقی ماند(R_f=0.0)

سیستم**II** : ۵ میکرولیتر از نمونه روی نوار سیلیکاژل لکه گذاری شد ودر نرمال سالین (Nacl:.9%) برای ۵ روز گذاشته شد.با شمارش میزان اکتیویته مشخص شد که گالیم – DTPA به جلو حرکت کرده در حالیکه آنتی بادی منوکلونال نشاندار در موقعیت شروع باقی مانده است.

b. کروماتوگرافی کاغذی

به کمک کروماتوگرافی کاغذی روی کاغذ واتمن و فاز متحرک متانول /آب (۴۵:۵۵) مشخص شد که در مقایسه با گالیم – DTPA بیش از ۹۴٪ اکتیویته در نقطه شروع باقی مانده است.بازده نشاندار سازی(۵± ۴۵)٪ بود (n=3) ، و فعالیت ویژه ۵۰۰MBq –۳۰۰ برای هر mg ۱ از ترکیب به دست آمد.

تست پایداری ترکیب نشاندار شده:

پایداری این ترکیب دربافر فسفات به کمک نگهداری محلول نهایی در ۴ در جه سانتی گراد در طول ۱۴ روز تعیین شد.همچنین پایداری در ۲۰- درجه سانتی گراد برای بیشتر از ۱ سال بررسی شد؛ و ظرفیت نشاندار سازی و خلوص رادیو شیمیایی تعیین گردید.

تست پایداری ترکیب نشاندار شده رادیویی در حضور سرم:

پایداری ترکیب در سرم خون به وسیله ژل- فیلتراسیون روی ستون سفارز (۱×۳۰cm) سنجش شد.ستون با بافر فسفات شستشو شد و فرکشن هایی حاوی۰/۵ ml جمع آوری شد.(سرعت جریان خارج شدن ml/min ۰/۵در دمای اتاق بود.)

پراکنش زیستی (Ga-DTPA-Rituximab) درموش صحرایی نرمال

برای تعیین نحوه پخش ، ترکیب حاصل به موش صحرایی های نرمال تزریق شد (۱۰۰- ۵۰)میکرولیتر ، محلول نهایی حاوی(۵ ± ۲۰) میکرو کوری رادیواکتیویته ، به روش داخل وریدی به رگ پشتی دم موشها تزریق شد حیوانات در فواصل زمانی ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق کشته شدند و فعالیت ویژه ارگانهای مختلف به صورت درصد دز نفوذ کرده در هر گرم از بافت محاسبه شد.

نتایج:

ترکیب آنتی بادی همراه با حلقه DTPA بدون آب و نشاندارسازی رادیویی با گالیم-۶۷ :

به منظور بهینه سازی پروسه و بهبود شکل گیری ترکیب، نتایج نشاندار سازی با نسبتهای مختلفی از DTPA / Rituximab مطالعه گردید (مطالعات*invitro*). ظرفیت نشاندار سازی رادیویی ۷۷٪ و فعالیت ویژه در حدودMBq ۵۰۰–۳۰۰ بود. به منظور تعیین بهترین زمان برای نشاندار سازی فرکشن های نهایی -Ga-DTPA Rituximab که حاوی حداکثرمیزان پروتئین بودند؛ با محلول گالیم کلراید [گالیم-۶۷] مخلوط و در دمای اتاق نگهداری شد.سپس مقداری ازاین مخلوط برداشته و به کمک RTLC تست شد ، نتیجه حاصل پس از گذشت ۱ ساعت این طور بود: بدون تغییر درمیزان گالیم آزاد نسبت به گالیم متصل به ترکیب نشاندار شده. مجددا مخلوط از ستون کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون رد شد تا مقادیر گالیم متصل اضافی حذف شوند.

فرکشن های خارج شده به وسیله روش رنگ سنجی معرف فولین چک شدند تا حضور پروتئین تائید شود. در شکل ۲ نشان داده شده که فرکشن شماره ۶ حاوی حداکثر مقدار آنتی بادی است که از اکتیویته ویژه مناسبی نیز برای تستهای حیوانی برخوردار است.

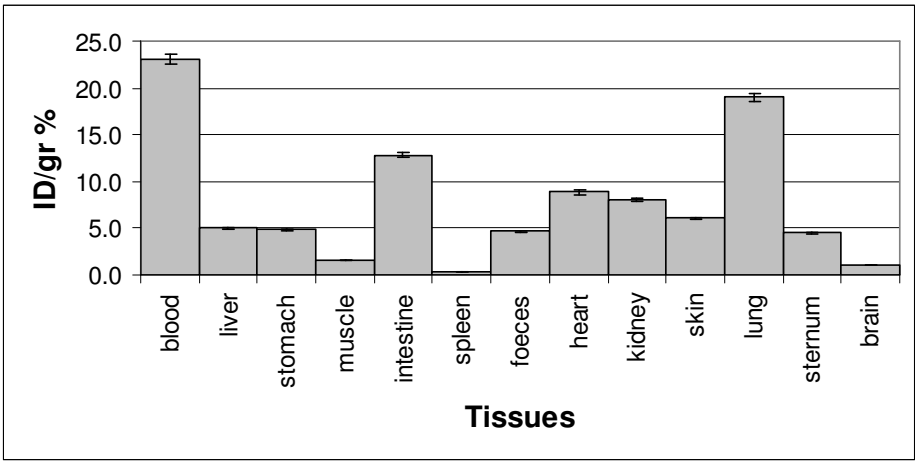
پایداری پروتئین نشاندار شده در مطالعات *invitro* (در شیشه):

انجام این تست در بافر فسفات و سرم خون انجام شد آنالیز به کمک RTLC نشان داد که پروتئینها نشان رادیویی خود را تا ساعتهای متمادی حفظ می کنند، که این موضوع دلیلی است بر اینکه ترکیب(آنتی بادی – پروتئین–گالیم) از پیوستگی بالایی برخوردار است.این نتایج به وسیله ژل – فیلتراسیون تائید شد.

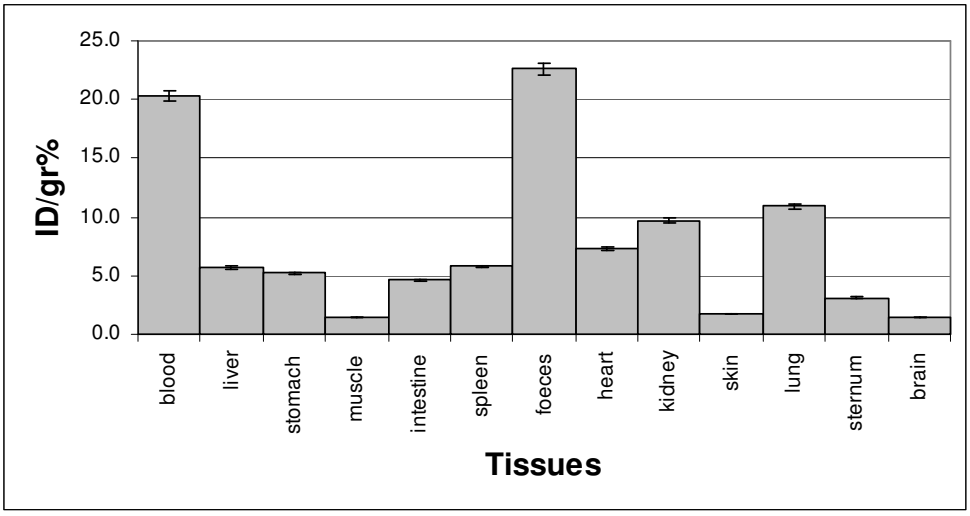
پس از انکوبه کردنGa-DTPA-Rituximab با بافر فسفات برای ۲ ساعت، نشان داده شد که تقریبا همه فعالیت رادیویی در موقعیت یکسانی نسبت به ترکیب اولیه باقی مانده است، یعنی گواهی برای رهایی گالیم آزاد به درون سرم وجود ندارد .به طور مشابه ژل – فیلتراسیون Ga-DTPA-Rituximab پس از ۲ ساعت انکوبه شدن با سرم خون انسانی نشان داد که تا یک دوره زمانی فعالیت رادیویی (رادیواکتیویته) هنوز در موقعیت یکسانی است و هیچ گواهی برای تجزیه یا انتقال گالیم از ترکیب به پروتئین های سرم وجود ندارد .

مطالعات پراکنش زیستی(مطالعات *invivo*):

پراکنشGa-DTPA-Rituximab در بافتها برای موش صحرایی های غیر بیمار (نرمال) تعیین شد حجم(ml ۰/۱) از ترکیب نهایی شاملMBq ۵/۲–۴/ ۴ به رگ پشتی دم تزریق شد میزان اکتیویته تزریق شده به هر موش به وسیله سرنگ ۱ میلی لیتری قبل و بعد از تزریق در یک موقعیت هندسی ثابت اندازه گیری شد . حیوانات در زمانهای انتخابی ۳و ۶ ساعت پس از تزریق به وسیله اتر کشته شدند (خون ، کبد ، معده، ماهیچه ، روده کوچک ، طحال ،استخوان ، قلب ،کلیه ، پوست ، شش(ریه)، مدفوع و مغز) وزن شدند و اکتیویته ویژه آنها به کمک اشعه گاما به صورت درصدی از دز تزریقی در هر گرم بافت تعیین شد (شکل های ۳ و ۴) .



شکل ۳–پراکنش زیستیGa-DTPA-Rituximab در موشهای صحرایی نرمال پس از گذشت ۳ ساعت از تزریق



شکل ۴-پراکنش زیستی Ga-DTPA-Rituximab در موشهای صحرایی نرمال پس از گذشت ۶ ساعت از تزریق

بحث و نتیجه گیری :

نشاندار سازی Ga-DTPA-Rituximab با بازده ۹۹٪ در حدود ۶۰ دقیقه طول می کشد . ایجاد اکتیویته ویژه مناسب از طریق افزودن کاتیون گالیم- ۶۷ شکل می گیرد .کمپلکس نشاندار شده رادیویی در سرم برای ۲۴ ساعت پایدار بود و مقدار چندان مهمی گالیم آزاد و Ga-DTPA مشاهده نشد . مقادیری از گالیم کلراید (تقریبا ۱ درصد) به وسیله TLC مشخص شد؛ که می توان آن را به کمک رد کردن از ستون کروماتوگرافی (ژل – فیلتراسیون) حذف کرد. پس از آماده سازی نهایی و تزریق به موش صحرایی های نرمال پراکنش زیستی رادیو دارو ۳ و ۶ ساعت پس از تزریق چک شد که نشان می دهد تجمع ترکیب رادیو اکتیو در بعضی از بافتها بیشتر است. نتیجه نهایی اینکه Ga-DTPA-Rituximab می تواند یک پروب خوب برای دزیمتری زیستی ترکیبات مربوط به این آنتی بادی درمانی باشد.

REFERENCES

1. J.F. Eary, O.W. Press, C.C. Badger, et al. J. Nucl. Med. 31, (1990) 1257–1268.
2. S.J. Knox, R. Levy, R.A. Miller, et al. Cancer Res 50, (1990) 4935–4940.
3. T.E. Witzig, C.A. White, G.A. Wiseman, et al. J Clin Oncol 17, (1999) 3793–3803.
4. T.E. Witzig, C.A. White, L.I. Gordon, et al. Blood 94, (1999) 631a.
5. A.R. Jalilian, P. Rowshanfarzad, K. Shafaii, et al. Nukleonika 50,
6. N. Marjolijn, H. Lub-de, G.W. Jos et al. Brit. J. Pharmacol. 143, (2004) 99-106.
7. D.J. Hnatowich, W.W. Layne, R.L. Child. Science 220, (1983) 613-619.