

تولید و کنترل کیفی آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTAدکتر کمال یآوری<sup>۱</sup><sup>۱</sup>نویسنده مسئول: استادیار گروه رادیوشیمی، آزمایشگاه رادیویوپزشکی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

E-mail: kyavari@aeoi.org.ir

## چکیده

**زمینه و هدف:** رادیوداروهای بر پایه آنتی بادی، امروزه در تصویربرداری و رادیوتراپی سرطان به شدت مورد توجه می‌باشند و یک وسیله بی نظیر برای انتقال اختصاصی رادیونوکلیدها به آنتی ژن‌های خاص در بافت بیمار فراهم می‌کنند. آنتی بادی منوکلونال آواستین با اتصال به فاکتور رشد اپی درمال عروقی و خنثی نمودن آن، رگ‌زایی القاء شده در تومورها را متوقف می‌نماید. در این تحقیق ترکیب ذره بتا با آنتی‌بادی آواستین به عنوان اولین قدم در تولید یک رادیوداروی جدید مورد بررسی قرار گرفت.

**روش کار:** در ابتدا آنتی بادی آواستین تخلیص گردید. آنتی بادی پس از کونژوگاسیون با DOTA-NHS تازه تهیه شده با ساماریم کلراید- $^{153}\text{Sm}$  نشاندار گردید. بازده نشاندارسازی و پایداری برون تنی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک اندازه گیری شد. برای بررسی آزمایش یکپارچگی (Integrity) ساختار آنتی بادی نشاندار شده از روش الکتروفورز پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد. نحوه توزیع حیاتی فرآورده در موش‌های BALB/C، ۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق بررسی گردید.

**یافته‌ها:** بازده نشان‌دارسازی بیشتر از ۹۸٪ بود. پایداری برون‌تنی فرآورده نشاندار شده در سرم تازه انسانی پس از ۱۲۰ ساعت  $83 \pm 2\%$  بود. در SDS-PAGE هیچ گونه شکستگی و قطعه شدنی در آنتی بادی نشاندار شده رخ نداد. بالاترین درصد رادیواکتیویته دز تزریق شده در هر گرم بافت (ID/g)، در کبد، ریه‌ها و کلیه مشاهده گردید.

**نتیجه گیری:** آنتی بادی منوکلونال آواستین علیه رگ‌زایی، به طور موثر با ساماریم  $^{153}\text{Sm}$  نشاندار گردید و مطالعه توزیع بیولوژیکی نشان داد که دارای ویژگی بالایی برای تجمع در بافت‌های غنی از رگ‌های خونی می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** رادیوایمونوتراپی؛ آواستین؛  $^{153}\text{Sm}$ ؛ DOTA-NHS

دریافت: ۹۰/۴/۱۴ پذیرش: ۹۰/۸/۳۰

## مقدمه

گزینش بالا و تمایل بالا به فاکتور رشد اپیدرمال عروقی (VEGF)<sup>۲</sup> متصل می‌شود. فاکتورهای رشد اپیدرمال عروقی در پرولیفراسیون، تمایز، رگ‌زایی و بقا سلولی نقش حیاتی دارند. فاکتور رشد اپیدرمال عروقی در سلول‌های نرمال، به خصوص سلول‌های با منشأ اپی‌تلیال در محدوده نرمال بیان می‌شود، در حالی که در سلول‌های سرطانی بیان آن به شدت

آنتی‌بادی‌های مختلفی در ترکیب با انواع رادیوایزوتوپ‌ها برای درمان و تشخیص ناهنجاری‌های مختلف استفاده شده است [۱،۲].

آنتی‌بادی منوکلونال آواستین<sup>۱</sup> آنتی‌بادی انسانی است که استفاده بالینی آن در انسان توسط FDA مورد پذیرش قرار گرفته است و اکنون به طور گسترده در جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. آواستین با

<sup>۲</sup>Vascular Epidermal Growth Factor<sup>۱</sup>Avastin(Bevacizumab)

لطفاً به این مقاله به شکل زیر ارجاع دهید:

افزایش می‌یابد و نقش مرکزی در تومورهای جامد ایفا می‌کند [۳].

موثر بودن عوامل درمانی همچون آواستین بر علیه فرایند رگزایی سرطان در مسیر میتوژنیک VEGF/VEGFR، به دلیل ایجاد عوارض جانبی سیتوتوکسیسیته محدود شده است و از طرف دیگر هدف دهی سلول‌های سرطانی توسط آنتی بادی به تنهایی باعث کاهش رشد سلولی می‌شود و الزاماً منجر به درمان تومور نمی‌شود [۸-۴].

اکنون مشخص شده است عوامل درمانی جدید که موجب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند، در مقایسه با عوامل مهارکننده رشد سلولی اهمیت بیشتری در درمان بیماری دارند. یکی از روش‌های هدایت سلول‌های سرطانی به سمت مرگ، رادیوایمونوتراپی هدفمند است. سیستم درمانی رادیوایمونوتراپی هدفمند نسبت به عوامل آنالوگ به کار رفته در هدف دهی سلول‌های سرطانی دارای چندین امتیاز می‌باشد؛ از جمله اینکه این سیستم‌های درمانی دسترسی بهتر و بیشتری به گیرنده‌های روی سلول‌های اندوتلیال جریان خون دارند، اثرات سیتوتوکسیسیته ویژه زیادی روی سلول توموری دارند، ناپایداری ژنتیکی بیشتری در سلول توموری ایجاد کرده و مقاومت درمانی سلول سرطانی را در هم می‌شکنند و در نهایت اینکه می‌توانند برای دسته وسیعی از سلول‌های افزایش بیان غیرطبیعی VEGF به کار روند [۸-۲]. این خصوصیات باعث شده است که فاکتور رشد اپیدرمال عروقی یک هدف مناسب برای استفاده در رادیوایمونوتراپی باشد. مطالعات متعددی وجود دارد که آواستین با ایزوتوپ‌های مختلف نشاندار شده است. از جمله آنها می‌توان به  $^{99m}\text{Tc}$ -avastin و  $^{111}\text{In}$ -avastin اشاره کرد که بیشتر برای اهداف تشخیصی تولید شده‌اند و نتایج تشخیصی خوبی در اکثر موارد (۷۰-۴۰ درصد) به همراه داشته‌اند [۷،۶].

بسیاری از ایزوتوپ‌های گسیل بتا از قبیل ایتیریم-۹۰ ( $^{90}\text{Y}$ ) و ایزوتوپ‌های گسیل گاما از قبیل ید-۱۳۱ ( $^{131}\text{I}$ ) می‌توانند در یک راکتور تولید شوند. وجود مشکلاتی از قبیل اثرات رادیولیز و تحمیل دز بالا در مورد  $^{131}\text{I}$  یا عدم دسترسی و تولید آسان در مورد  $^{90}\text{Y}$  باعث شده است که این دسته از ایزوتوپ‌ها در برخی مواقع جایگاه خود را به ایزوتوپ‌هایی مثل هلمیم-۱۶۶، لوتسیم-۱۷۷ و ساماریم  $^{153}\text{Sm}$  بدهند.  $^{153}\text{Sm}$  به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی مناسب، هزینه‌های جانبی کم، فراوانی در طبیعت، تولید آسان، و خلوص رادیوشیمیایی بالا، رادیونوکلید مناسبی برای استفاده در رادیوایمونوتراپی می‌باشد [۱۱-۹].

نکته دیگر در این پژوهش سنتز و استفاده از شلاتور دوکاره DOTA-NHS<sup>۱</sup> می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب دارای کارآرایی بیولوژیکی خوبی در ارتباط دادن آنتی‌بادی به ایزوتوپ می‌باشد. در این مطالعه آواستین به عنوان یک رادیوایمونوکونژوگ تولید و آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی، کنترل کیفی در سیستم داخل بدن حیوان (*In vivo*) و محیط بیرون (*In vitro*) به عنوان اولین قدم در تولید یک رادیوداروی جدید مورد ارزیابی قرار گرفت.

### روش کار

**تولید  $^{153}\text{Sm}$ :**  $^{153}\text{Sm}$  توسط تابش نوترونی اکسید ساماریم  $^{152}\text{Sm}_2\text{O}_3$  غنی شده در راکتور تحقیقاتی تهران با شار نوترونی  $1.0 \times 10^{13} \text{ n/cm}^2$  به مدت ۳ روز تولید شد. محصول پرتودهی شده در  $0.2\text{HCl}$  مولار حل گردید و از طریق فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر تخلیص شده و برای نشاندارسازی آماده گردید.

<sup>1</sup>N-succinimidyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetra- acetic acid

۴۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه گردید و در آخر EDTA (۱۰ میلی مول، ۱/۹ حجم نمونه) به کمپلکس اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه دیگر در بن ماری انکوبه گردید. کمپلکس آواستین- $^{153}\text{Sm}$  DOTA-NHS حاصل از طریق ستون‌های ژل فیلتراسیون PD<sub>10</sub> توسط بافر PBS تخلیص گردید.

### آزمایشات کنترل کیفی

**تولید و خلوص  $^{153}\text{Sm}$ :** خلوص رادیونوکلیدی  $^{153}\text{Sm}$  با استفاده از اسپکتروفتومتر گاما مدل  $^2\text{HPGe}$  کنترل گردید.

**خلوص رادیوشیمیایی:** کارآرایی نشاندارسازی توسط کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)<sup>۳</sup> با استفاده از نوارهای واتمن شماره ۱ و بافر DTPA<sup>۴</sup> (۱۰ mM) به عنوان حلال ارزیابی گردید (شکل ۱).

**پایداری آواستین نشاندار با  $^{153}\text{Sm}$ :** نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری از سرم خون تازه انسانی تهیه گردید. به هر کدام از نمونه‌ها  $^{153}\text{Sm}$ -DOTA-NHS / ۱۰۰ μCi / ۱۰۰ μg آواستین- $^{153}\text{Sm}$  اضافه و نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پایداری نمونه‌ها در ساعت‌های ۰، ۴، ۸، ۲۲ و ۹۶ و ۱۲۰ پس از انکوباسیون، توسط TLC ارزیابی گردید. برای بررسی پایداری فراورده در شرایط ۴ درجه سانتی گراد، دمای اتاق و بافر فسفات روش مشابه با سرم به کار رفت.

**صحت ساختار رادیوایمنوکونژوگه:** احتمال وقوع تغییرات ساختاری در آواستین به واسطه نشاندارسازی با رادیوایزوتوپ با استفاده از SDS-PAGE بررسی گردید.

**مطالعات توزیع بیولوژیکی:** جهت بررسی توزیع بیولوژیکی نرمال فراورده، برای هر ساعت و هر گروه مورد مطالعه (گروه شاهد و گروه تیمار شده)

**تهیه آنتی بادی:** محلول آواستین (۲۵ mg/mL) از کمپانی مرک تهیه شد و با استفاده از اولترا فیلتر آمیکون (MWCO = ۳۰۰۰۰) شستشو گردید. جهت نمک زدایی و تعویض بافر، محلول سه بار با بافر کونژوگه (بافر بیکربنات ۰/۲ مولار و pH=۹/۲) شستشو شد. غلظت نهایی آنتی‌بادی ۱۰ mg/mL شد و در ویال‌های متعدد فریز گردید.

**تهیه کونژوگه آواستین-DOTA-NHS:** NHS (خریداری شده از کمپانی Macrocylics Inc, Dallas, US) در نسبت مولی ۵۰ با آنتی‌بادی، در ۰/۵ میلی‌لیتر بافر بیکربنات حل گردید. آواستین (۵ mg/۰/۵ mL) در بافر بیکربنات به طور آهسته به محلول DOTA-NHS اضافه و به طور آرام به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق مخلوط گردید. واکنش کونژوگه سازی با اضافه کردن بافر آمونیوم استات (۰/۲۵ میلی مولار و ۵/۵ pH=) و سپس سانتریفیوژ به اتمام رسید. محلول حاصل ۳ تا ۵ بار با همین بافر توسط اولترا فیلتر-۱۵ شستشو شد تا این که غلظت محلول فیلتر شده در بیوفتومتر در طول موج ۲۸۰ نانومتر مساوی صفر شد. ایمنوکونژوگه حاصل در ۴ درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

**تعیین میانگین نسبت مولی شلاتور به آنتی بادی:** جهت پیدا کردن نسبت تعداد گروه‌های شلاتور و آنتی‌بادی در مرحله کونژوگه سازی، روش اسپکتروفتومتری پی پین به کار رفت. تعداد شلاتور به ازای هر آنتی‌بادی توسط تیتراسیون کمپلکس Cu (II)-Aresenazo مشخص گردید [۱۲].

**نشاندار سازی با رادیوایزوتوپ  $^{153}\text{Sm}$ :** کلراید  $^{153}\text{Sm}$  (۲-۳ mCi) در حجم ۲۰-۱۰ میکرولیتر HCl ۰/۲ مولار به ۰/۵ ml بافر آمونیوم استات اضافه شد، سپس کونژوگه آواستین-DOTA-NHS (۱ mg) به آن اضافه کرده و به آرامی مخلوط شد. کمپلکس در

<sup>2</sup>High-Purity Germanium

<sup>3</sup>Thin Layer Chromatography

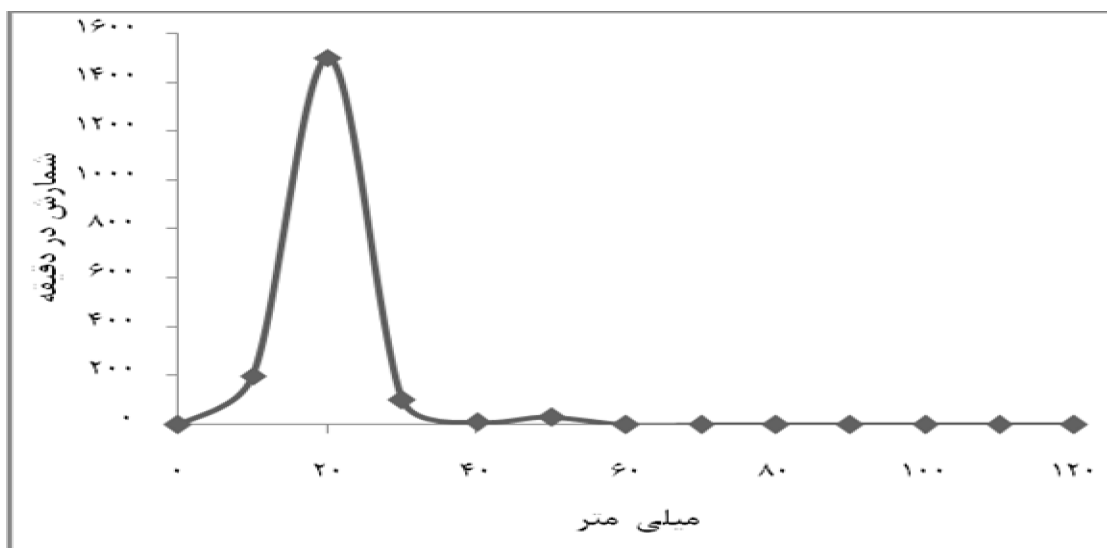
<sup>4</sup>Diethyl Lenetriamine Penta-Acetic Acid

<sup>1</sup>Molecular Weight Cut-off

آشکارساز HPGe به مدت چند روز، ناخالصی ثبت نگردید.

**خلوص رادیوشیمیایی:** خلوص رادیوشیمیایی به دست آمده از طریق TLC نشان داد که بالاترین اکتیویته در قسمت پایین کاغذ دیده می‌شود (شکل ۱). همان طوری که در شکل مشخص است، خلوص رادیوشیمیایی کمپلکس پس از ۱ ساعت انکوباسیون، بیشتر از  $2 \pm 97\%$  است.

سه موش در نظر گرفته شد. به هر کدام از موش‌های با وزن تقریبی ۲۵-۳۵ گرم، تقریباً  $100 \mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$  آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA-NHS یا  $^{153}\text{SmCl}_3$  از طریق ورید دم تزریق گردید. موش‌ها در ساعت‌های ۰، ۲، ۲۴، ۴۸، و ۷۲ پس از تزریق بی‌هوش شدند و از آنها خونگیری به عمل آمد. سپس بافت‌های مختلف آنها جدا شده و درصد رادیواکتیویته دز تزریق شده به ازای هر گرم بافت



شکل ۱. خلوص رادیوشیمیایی نشاندارسازی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک. شمارش‌ها از قطعات مختلف کاغذ ثبت شده است و بیشترین شمارش مربوط به آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA در محل لکه گذاری می‌باشد.

**پایداری آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA:** نتایج حاصل از TLC نشان داد که بیش از ۸۵٪ کل رادیواکتیویته به یک قله همگن مشابه با آنتی بادی نشاندار نشده مربوط است کمپلکس در دمای اتاق، ۴ درجه سانتی‌گراد و فسفات در زمان‌های مختلف تا ۱۲۰ ساعت، بیش از ۹۶٪ پایداری داشت. پایداری فرآورده در شرایط مختلف ذکر شده تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ). همچنین پایداری نمونه در سرم خیلی خوب بود. به طوری که تا ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون تفاوت معنی‌داری نسبت به شرایط ذکر شده در بالا نشان نمی‌داد، هر چند که با گذشت زمان اندکی کاهش در پایداری آن مشاهده گردید ( $p > 0.05$ ). پایداری آنتی‌بادی نشاندار شده در بافر

(ID/g%) با استفاده از سیستم HPGe اندازه‌گیری گردید.

#### آنالیز آماری:

روش آماری به کار رفته در این مطالعه، روش One Way ANOVA بود و داده‌ها توسط نرم افزار SPSS.13 تجزیه و تحلیل شد. در تمامی آزمایش‌ها مقادیر  $p < 0.05$  به عنوان نتیجه یا تفاوت قابل توجه در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین انحراف معیار بیان گردیده است.

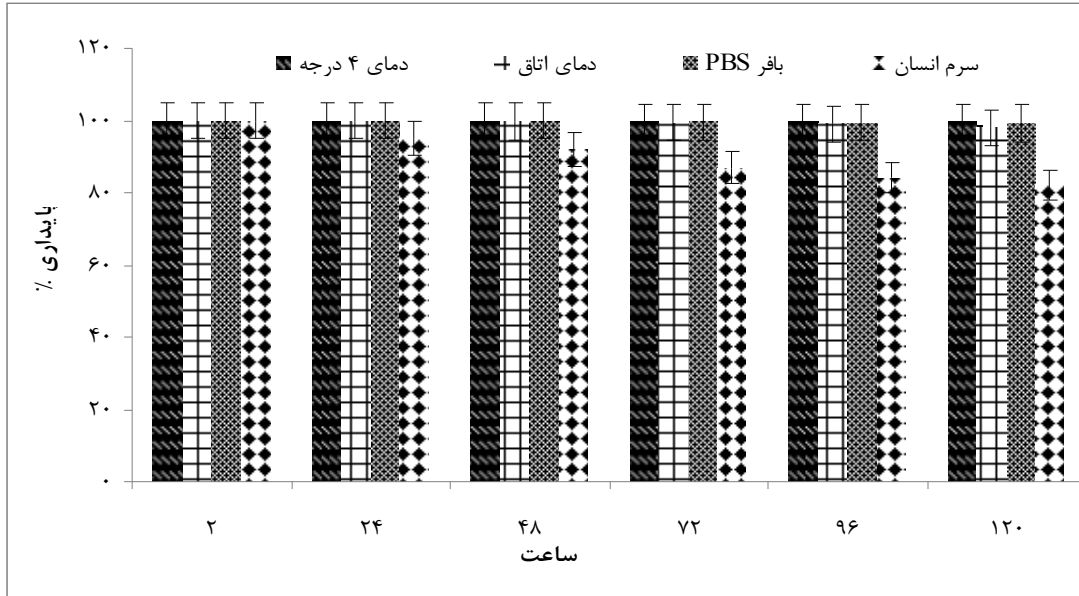
#### یافته‌ها

**تولید  $^{153}\text{Sm}$ :** رادیونوکلید  $^{153}\text{Sm}$  با فعالیت ویژه  $2 \text{mCi}/\mu\text{g}$  تولید شد و با بررسی آن در سیستم

و سرم خون انسان مطلوب بودن فرآورده تولید شده را برای استفاده در مطالعات درون تنی نشان می‌دهد (شکل ۲).

۱- سایز مارکر پروتئینی-۲- آواستین طبیعی ۳- کنژوگه آواستین ۴- آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA

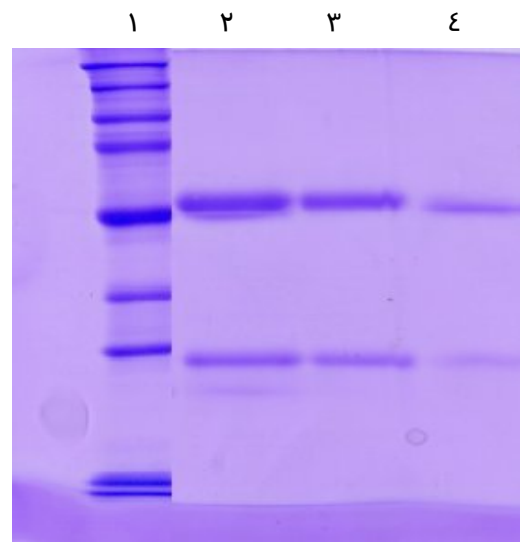
مطالعات توزیع بیولوژیکی: شکل ۴ و ۵ نتایج حاصل



شکل ۲. پایداری *in vitro* آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA پس از نگهداری در شرایط مختلف

از توزیع حیاتی  $^{153}\text{SmCl}_3$  یا آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA را در موش‌های سالم ۲ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق وریدی بر حسب متوسط درصد دز تزریق شده در هر گرم از بافت نشان می‌دهد. در زمان‌های مختلف پس از تزریق، از موش‌ها خونگیری به عمل آمد و سپس اندام‌های آنها تشریح گردیدند. شکل ۴ توزیع بیولوژیکی  $^{153}\text{SmCl}_3$  نشان می‌دهد. بالاترین برداشت در استخوان و کبد مشاهده گردید و ارگان‌های دیگر در مقایسه با این دو بافت برداشت قابل ملاحظه‌ای نداشتند ( $p < 0.05$ ). شکل ۵ توزیع بیولوژیکی آواستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA را نشان می‌دهد و بالاترین ID/g% در کبد، طحال، ریه‌ها و خون مشاهده گردید ( $p > 0.05$ ) ولی در مقایسه، بافت‌های دیگر برداشت قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند ( $p < 0.05$ ).

آزمایش صحت ساختار آواستین: نتایج ژل الکتروفورز پلی آکرلامید نشان داد که مراحل مختلف نشاندارسازی منجر به شکستگی در ساختمان آنتی‌بادی نشده است (شکل ۳).



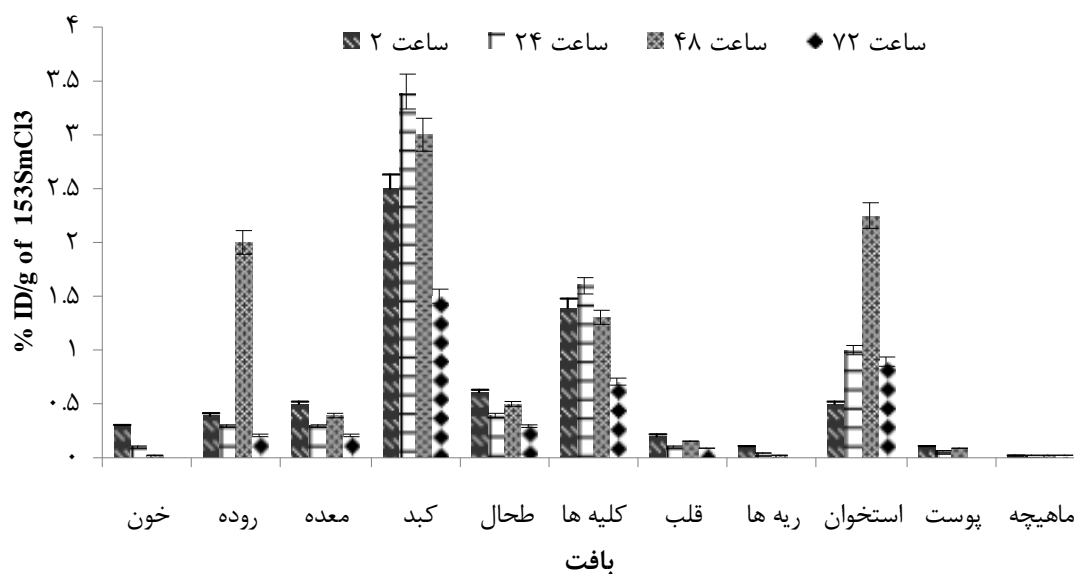
شکل ۳. ژل الکتروفورز برای بررسی صحت ساختار آواستین:

## بحث

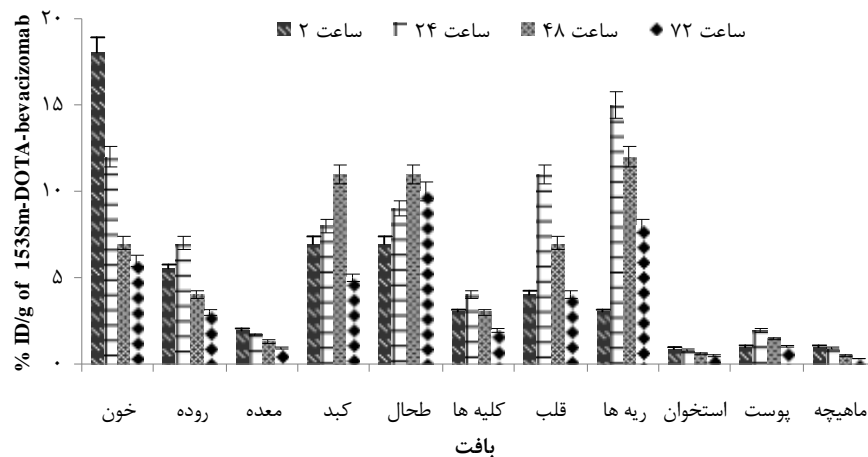
حیاتی و پایداری عوامل هدفمند در آن مورد توجه و

طراحی یک رادیوداروی هدفمند مجموعه پیچیده‌ای

بررسی قرار گیرد [۱۳].



شکل ۴. توزیع بافتی  $^{153}\text{SmCl}_3$  در موش نرمال. مقادیر به صورت میانگین درصد دز تزریق شده به ازای هر گرم بافت می باشد (ID/g%, n=۳)



شکل ۵. توزیع بافتی اوستین- $^{153}\text{Sm}$ -DOTA در موش نرمال. مقادیر به صورت میانگین درصد دز تزریق شده به ازای هر گرم بافت می باشد (ID/g%, n=۳)

در مطالعات رادیوایمنوتراپی عمدتاً از وکتورهای هدفمند (IgG) استفاده می‌شود. مطالعات زیادی وجود دارد که از آواستین در ترکیب با داروهای

است، که باید عوامل زیادی از جمله کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی رادیونوکلید، شیمی نشاندارسازی و رفتارهای توزیع

شیمی درمانی مختلف جهت درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده شده است. این مطالعات با نتایج امیدوارکننده‌ای نیز همراه بوده‌اند. اما چون احتمال القاء توکسیسیتی‌های زیاد و ایجاد عوارض جانبی در استفاده از دزهای بالای آنها وجود دارد و از طرف دیگر برای اینکه سطح موثر درمان افزایش پیدا کند، استفاده از ترکیبات موثرتر همراه با آنتی‌بادی‌ها رویکردهای جدید درمانی را مطرح کردند. سیستم رادیوایمنوترایی، از جمله مهمترین روش‌های ترکیبی می‌باشد؛ که یک سیستم دوکاره هوشمند است [۸-۶]. قبل از اینکه یک رادیودارو بتواند در سیستم بالینی استفاده شود لازم است که کنترل کیفی شده و ویژگی‌های آن تایید شود که از جمله آنها می‌توان به نشاندارسازی موفق، خلوص و کتور نشاندار (آنتی‌بادی)، پایداری درون تنی و حفظ پایداری در اتصال به هدف اختصاصی اشاره کرد. برای دستیابی به این امور، حضور یک شلاتور به عنوان ستون استحکام بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن نیز یک شرط اساسی است [۱۴].

در این مطالعه سعی شد که به این مولفه‌های مهم در طراحی یک سیستم رادیوایمنوترایی توجه شود. اولین مساله انتخاب آواستین بود. همان‌طور که می‌دانیم رگ‌زایی مشخصه عمومی اکثر سرطان‌های دچار متاستاز است و استراتژی‌های درمانی علیه سرطان بیشتر از طریق مهار رشد و رگ‌زایی جدید می‌باشد. این موضوع در انکولوژی بالینی اهمیت فوق‌العاده‌ای پیدا کرده است [۸-۶].

در این مطالعه به دلیل نقش مرکزی VEGF در رگ‌زایی، آنتی‌بادی علیه آن یعنی آواستین به عنوان وکتور برای رادیوایمنوترایی طراحی گردید. با توجه به اینکه آنتی‌بادی تهیه شده دارای ناخالصی‌هایی است که در انجام کونژوگه و نشاندارسازی ایجاد تداخل می‌نمایند، ابتدا با استفاده از فیلترهای کاتاف کمتر از آنتی‌بادی، تخلیص گردید و شرایط آن به بافر کونژوگه تغییر داده شد. شلاتور به کار رفته

DOTA-NHS بود و علت انتخاب آن استحکام بخشیدن به فراورده‌های رادیوکتیو در سیستم درون تنی می‌باشد. کونژوگه آواستین DOTA-NHS چندین بار شستشو و تغییر بافر داده شد تا شلاتورهای آزاد جدا شوند. نسبت مولاریته شلاتور به آنتی‌بادی در تشکیل کونژوگه، با استفاده از سیستم رنگ سنجی پپین تعیین گردید. نتایج نشان دادند که که بهترین مولاریته به دست آمده برای کونژوگه نسبت مولی ۱:۲ می‌باشد و دلیل آن می‌تواند بهینه بودن شرایط از قبیل انتخاب بافر مناسب، تخلیص آنتی‌بادی و دیگر عوامل موثر بر کونژوگه‌سازی باشد. کل عملیات نشاندارسازی کونژوگه با  $^{153}\text{Sm}$  ۱/۵ ساعت طول کشید. تکرارپذیری روش نشاندارسازی، استاندارد بودن روش نشاندارسازی ما را تایید نمود.

پایداری فراورده در سرم و شرایط مختلف ارزیابی شد. نتایج نشان داد که خلوص رادیوشیمیایی فراورده در اکثر شرایط در سطح بالا باقی مانده است و ایزوتوپ آزاد وجود ندارد. این پایداری می‌توانست حاکی از بهینه کردن کلیه روش و از همه مهمتر نقش و نحوه اتصال شلاتور به کار رفته در مطالعه ما باشد. این پایداری، نگهداری و به کارگیری فراورده در مطالعات بالینی را امیدوار ساخت.

جهت ارزیابی توزیع حیاتی، فرآورده نهایی و ایزوتوپ آزاد به موش‌ها تزریق شدند. پس از ساعت‌های مختلف تزریق، برداشت آنها در بافت‌های مختلف مطالعه گردید. مشاهده شد که  $^{153}\text{SmCl}_3$  بیشتر در استخوان و کبد تجمع پیدا می‌کند که دلیل احتمالی این امر به ترتیب مسیر تجمع و نفوذپذیری بالای آن در این اندام‌ها است. همچنین برداشت کبدی احتمالاً به خاطر تجمع کاتیونی  $^{153}\text{Sm}$  آزاد می‌باشد. اندام‌های دیگر برداشت واضحی نداشتند. از طرف دیگر، برداشت فراورده آواستین-DOTA-NHS- $^{153}\text{Sm}$  در کبد، طحال، ریه‌ها، قلب و خون بالاترین درصد را داشت. این برداشت در فاصله زمانی ۲۴-۴۸ ساعت

یک عامل برای این اختلاف می تواند بهینه بودن شرایط کاری ما و همچنین به کارگیری شلاتور DOTA-NSH به جای شلاتور DTPA باشد. توزیع بیولوژیکی فراورده در اکثر مطالعات از یک روند مشابهی تبعیت می کند که احتمالاً به مسیر های متابولیسم و دفع اواستین (بیشتر) و ایزوتوپ بر می گردد، چنانکه نشاندارسازی bevacizumab توسط مس-۶۴ و ایندیم با یافته های ما در مورد توزیع بیولوژیکی تطابق دارند [۱۷،۱۸].

### نتیجه گیری

این تحقیق نشان داد که پرتو داروی جدید می تواند یک کاندیدای امیدوارکننده جهت استفاده در درمان طیف وسیعی از بیماری های دچار رگژیایی غیرطبیعی باشد. مطالعات ما با ایجاد تومور و ارزیابی تغییرات توزیع و نسبت های توزیع خون به بافت های توموری و همچنین مطالعات سلولی جهت تایید بیشتر این فراورده ادامه دارد.

قابل توجه بود. یک دلیل برای برداشت نسبتاً بالای این ارگان ها می تواند حجم قابل توجه جریان خون به این یافت ها و همچنین نفوذپذیری بالای آنها باشد. برداشت کبد قابل ملاحظه بود که احتمالاً به خاطر مسیر دفعی اواستین می باشد. با توجه به اینکه آواستین یک منوکلونال آنتی بادی است، برداشت در کبد و تجزیه بعدی آن یک نتیجه مورد انتظار می باشد [۱۸-۱۴]. پایین بودن درصد اکتیویته در استخوان می تواند یکی از نشانه های پایدار بودن فراورده اواستین-DOTA-NHS-<sup>153</sup>Sm در شرایط *in vivo* باشد؛ چرا که <sup>153</sup>Sm آزاد بیشتر در استخوان تجمع پیدا می کند.

در این مطالعه برای اولین بار، آواستین با ساماریم نشاندار گردید و همان طوری که در مقدمه اشاره شد مطالعات مشابه کمتری در این زمینه وجود دارد. مطالعات انجام گرفته توسط تعدادی از محققان برای نشاندارسازی DTPA-anti VEGF با بیسموت ۲۱۳ پایداری کمتری (کمتر از ۸۰٪ در سرم پس از ۲۴۰ دقیقه) در مقایسه با پایداری به دست آمده برای فراورده ما (بیش از ۸۵٪ پس از ۴ روز) داشت [۱۴].

### References

- 1- Gaze MG. The current status of targeted radiotherapy in clinical practice. *Phys Med Biol.* 1996 Oct; 41(10):1895-1903.
- 2- Marques F, Paulo A, Campello MP, Lacerda S, Vitor RF, Gano L, et al. Radiopharmaceuticals for targeted radiotherapy. *Radiat Prot Dosimetry.* 2005 Dec; 116 (1-4): 601-604.
- 3- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol.* 1995 May; 146(5):1029-1039.
- 4- Ruegg C, Hasmim, M, Lejeune FJ, Alghisi GC. Antiangiogenic peptides and proteins: from experimental tools to clinical drugs. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Apr; 1765(2):155-177.
- 5- Mitra A, Nan A, Papadimitriou JC, Ghandehari H, Line BR. Polymer-peptide conjugates for angiogenesis targeted tumor radiotherapy. *Nucl Med Biol.* 2006 Jan; 33(1):43-52.
- 6- Paudyal B, Paudyal P, Oriuchi N, Hanaoka H, Tominaga H, Endo K. Positron emission tomography imaging and biodistribution of vascular endothelial growth factor with 64 Cu-labeled bevacizumab in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci.* 2011 Jan; 102(1):117-121.
- 7- Stollman TH, Scheer MG, Leenders WP, Verrijp KC, Soede AC, Oyen WJ, et al. Specific imaging of VEGF-A expression with radiolabeled anti-VEGF monoclonal antibody *Int J Cancer* 2008 May; 122(10): 2310-2314.



- 8-Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, Lyden D, Rafii S, Haimovitz F et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*. 2003 Dec; 300 (5622): 1155-1159.
- 9- Nayak D, Lahiri S. Application of radioisotopes in the field of nuclear medicine. *J Radioanal Nucl Chem*. 1999 Nov; 242(2):423-432.
- 10- Knox SJ, Levy R, Miller RA, Uhland W, Schiele J, Ruehl W *et al*. Determinants of the antitumor effect of radiolabeled monoclonal antibodies. *Cancer Res*. 1990 Aug; 50:4935-4940.
- 11- Fani MS, Vranjes SC, Archimandritis S, Potamianos S, Xanthopoulos P, Bouzoukis AD. Labeling of monoclonal antibodies with <sup>153</sup>Sm for potential use in radioimmunotherapy. *Appl Radiat Isot* 2002 Nov; 57(5): 665–674.
- 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 Jul-Aug; 3(4):342-345.
- 13- Boswell C A, Brechbiel WM. Development of radioimmunotherapeutic and diagnostic antibodies: an inside-out view. *Nucl Med Biol*. 2007 Oct; 34(7); 757-778.
- 14- Rizvi SMA, Song EYJ, Raja C, Beretov J, Morgenstern A, Apostolidis C, et al. Preparation and testing of bevacizumab radioimmunoconjugates with bismuth-213 and bismuth-205/bismuth-206. *Cancer Biol Ther*. 2008 Oct; 7(10):1547-1554.
- 15- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000 Sep; 21(3): 505-515.
- 16- Taraboletti, G. and Margosio, B. Antiangiogenic and antivascular therapy for cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2001 Aug; 1(4):378-384.
- 17- Nagengast BW, Elisabeth G, Hospers GA, Mulder NH, de Jong JR, Hollema H, et al. In vivo VEGF Imaging with radiolabeled bevacizumab in a human ovarian tumor xenograft. *J Nucl Med*. 2007 Aug; 48 (8):1313–1319.
- 18- Bishnuhari P, pramila P, Noboru O, Hirofumi H, Hideyuki T, Keigo E, et al. Bevacizumab significantly reduced tumor accumulation of <sup>64</sup>Cu-DOTA- bevacizumab. *Cancer Sci*. 2011 Jun; 102 (1):117-121.

## Production and Quality Control of $^{153}\text{Sm}$ -DOTA -Avastin

Yavari K, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Corresponding Author: Assistant Prof. of Radiochemistry Dept. Radiobiomedical Laboratory, Nuclear Sciences and Technology Research Institute, Tehran, Iran. E-mail: kyavari@aeoi.org.ir

### ABSTRACT

**Background & Objectives:** Antibody-based radiopharmaceutical drugs are the great current interest in imaging and radiotherapy of cancers, and provide an important tool for target-specific delivery of radionuclides to specific antigens in the diseased tissues. The monoclonal antibody avastin binds, neutralizes VEGF (Vascular endothelial growth factor) and blocks VEGF-induced angiogenesis in tumor tissues. In this study, the complex of avastin and beta particle was investigated as a first step in the production of a radiopharmaceutical drug.

**Methods:** Antibody of avastin was prepared and purified. The antibody was conjugated with freshly prepared DOTA-NHS and then labeled with  $^{153}\text{Sm}$ -samarium chloride (185 MBq). The efficiency and in vitro stability of antibody labeling were determined using thin layer chromatography. The integrity of the radiolabeled antibody was checked by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) protocol. Biodistribution study of  $^{153}\text{Sm}$ -DOTA -Avastin was performed in BALB/c mice at 2, 24, 48 and 72 hours after injection.

**Results:** The efficiency of antibody labeling was more than 98%. The in vitro stability of the labeled product in human serum after 120h was  $83 \pm 2\%$ . There was no fragmentation in the labeled antibody during SDS-PAGE protocol. The highest (%ID/g) was observed in the liver, lungs and kidneys.

**Conclusion:** The monoclonal antibody avastin against angiogenesis was effectively radiolabeled with  $^{153}\text{Sm}$ . The Biodistribution study showed that it has a high specificity to accumulation in tissues with enriched blood vessels.

**Key words:** Radioimmunotherapy; Avastin;  $^{153}\text{Sm}$ ; DOTA-NHS