

Shrnutí

Radiofarmaka, jejichž součástí jsou radioaktivně značené sloučeniny, patří k účinným nástrojům v lékařské diagnostice i terapii. Jako výhodné nosiče radionuklidů lze použít protilátky, které se specificky vážou na svůj antigen. Monoklonální protilátka TU-20 je specifická proti III β -tubulinu, který se vyskytuje pouze v tkáních nervového původu. Označením TU-20 radioisotopy jodu se získá radiofarmakum vhodné pro diagnostiku periferních neuropatií. Pro rychlejší fyziologickou distribuci přípravku je možné zaměnit protilátku za její scFv fragment, který má šestkrát menší velikost. Pro zjištění vlastností značených protilátek se využívá několik metod kontroly kvality.

Monoklonální protilátka TU-20 a scFv TU-20 byly jodovány isotopy ^{125}I i ^{123}I především pomocí chloraminu-T jako oxidačního činidla. Imunoreaktivita se pro značenou TU-20 stanovovala ELISA testem. Radiochemická stabilita se sledovala gelovou filtrací. Vznik fragmentů protilátky při značení se určoval elektroforézou spojenou s barvením stříbrem a autoradiografií. Vazba protilátek v tkáni se sledovala imunohistochemicky přes autoradiografii a optickou mikroskopii. S $[^{125}\text{I}]\text{TU-20}$, $[^{125}\text{I}]\text{scFv TU-20}$ a Na^{125}I se provedla fyziologická distribuce ve zdravých myších.

Pro přípravu $[^{125}\text{I}]\text{TU-20}$ pomocí chloraminu-T bez použití jodačního činidla byl průměrný výtěžek 0,72 a poměr jodu ku protilátce 1,11 a pro $[^{125}\text{I}]\text{scFv TU-20}$ se OY rovnal 0,50 a N_I/N_S byl 0,52. Radiochemická čistota $[^{125}\text{I}]\text{TU-20}$ klesla za necelé dva měsíce o méně než 20%, ale u $[^{125}\text{I}]\text{scFv TU-20}$ o 50%. Elektroforézou se zjistilo, že přidání redukčního činidla zamezuje jodaci pomocných látek při odsolení. Z provedené imunohistochemie vyplynulo, že radioaktivně značená protilátka TU-20 si zachovává svou schopnost vázat se v tkáni na svůj antigen. Fyziologické testy potvrdily, že celá protilátka TU-20 se eliminuje z těla výrazně pomaleji než scFv TU-20 a že fragment jeví větší podobnost při eliminaci z organismu s jodidem než s protilátkou.

Souhrnem řečeno, byla připravena radiojodovaná protilátka TU-20 i její scFv fragment a provedena jejich kontrola kvality metodami analytickými, bioanalytickými i biologickými, z nichž mnohé se navzájem ve svých výsledcích doplňovaly.

Abstract

PROPOSAL OF QUALITY CONTROL METHODS FOR ANTIBODIES AND THEIR FRAGMENTS LABELLED BY RADIOACTIVITY

Labelled compounds are in nuclear medicine worthwhile as diagnostic and therapeutic tool. Antibodies owing to the specific binding their antigens belong to favourable carriers for radionuclides. The monoclonal antibody TU-20 against III β -tubulin, which is specific to the tissue of neuronal origin, could be labelled with iodine radioisotopes. Thus obtained radiopharmaceutical should serve for diagnosis of peripheral neuropathies. Also the fragment scFv TU-20 is disposal for the preparation of a new radiopharmaceutical. Nevertheless, a quality control by several analytical methods is necessary after the labelling procedure.

The monoclonal antibody TU-20 and scFv TU-20 were labelled with ^{125}I and ^{123}I by chloramine-T as an oxidizing agent. Immunoreactivity of labelled TU-20 was determined by ELISA and radiochemical stability was studied by gel filtration. Fragmentation of labelled antibody was estimated by electrophoresis followed by silver staining and autoradiography. Antibody binding in tissue slices was studied by immunohistochemistry. Finally, biodistribution of [^{125}I]TU-20, [^{125}I]scFv TU-20, and Na ^{125}I was done in normal mice.

[^{125}I]TU-20 and [^{125}I]scFv TU-20 were mostly prepared via chloramine-T oxidation without reduction. Average yield was 0.72 and 0.50, and molar ration of radioiodine to antibody was 1.11 and 0.52 for [^{125}I]TU-20 and [^{125}I]scFv TU-20, resp. Radiochemical purity of [^{125}I]TU-20 decreased in two months less than 20%, however, purity of [^{125}I]scFv TU-20 fell to 50%. It was investigated that stopping reaction by reducing agent prevents undesirable iodination of adjuvans. Labelled antibody and its fragment preserved their binding ability to their antigen in tissue, which was confirmed by immunohistochemistry. Biodistribution studies verified different behaviour of [^{125}I]TU-20, [^{125}I]scFv TU-20, and Na ^{125}I during distribution and elimination from the mouse body. Whole antibody is cleared from the body considerably slower than its fragment or iodide.

In summary, the monoclonal antibody TU-20 and its fragment were radioiodinated and afterwards analyzed by several quality control methods.