

BR 9126568

ISSN 0101-3084



CNEN/SP

ipen Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares

RADIOIODAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CEA INTACTO

Helena OKADA, Iracelia Torres de Toledo e SOUZA
e Constância Pagano Gonçalves da SILVA

IPEN - PUB - - 322 .

PUBLICAÇÃO IPEN 322

NOVEMBRO/1990

SÃO PAULO

RADIOIODAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CEA INTACTO

**Helena OKADA, Iracelia Torres de Toledo e SOUZA
e Constância Pagano Gonçalves da SILVA**

DEPARTAMENTO DE PROCESSAMENTO

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO - BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

B13.00

**MONOCLONAL ANTIBODIES
IODINATION**

IPEN - Doc - 3810

Aprovado para publicação em 28/09/90

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são de responsabilidade do(s) autor(es).

RADIOIODINATION OF MONOCLONAL ANTIBODY INTACT ANTI-CEA*

**Helena OKADA, Iracelia Torres de Toledo e SOUZA,
Constancia Pagano Gonçalves da SILVA**

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - Brasil

ABSTRACT

The purpose of this study is to examine a convenient system that can be used to iodinate monoclonal antibodies which is rapid, simple, efficient and reproducible, and which can be accomplished in radiopharmaceutical laboratories. It is important to remember that antibodies are sensitive biochemicals, subject to losses of the activity that is essential to their mode of action, namely the ability to bind specific antigen.

The advent of solid phase iodination agents has greatly expanded the range of gentle iodination techniques available for iodinating sensitive biological materials. The agent most widely used is the Iodogen (1,3,4,6 tetrachloro-3a-6a diphenylglycoluril) method.

Anti-CEA 4C₁₁ IgG_{2a,k} (prepared in the Ludwig Institute-São Paulo-Brasil) is used as model to evaluate the Iodogen methodology.

The miniature chromatographic system, also rapid, accurate, simple, efficient was elaborated to determine the labelling efficiency incorporation of iodine into immunoglobulin, and the radiochemical purity of ¹³¹I-anti-CEA.

(*) Paper presented at 5th Congress - World Federation of Nuclear Medicine & Biology, held in Montreal-Canada, August 26 - 31, 1990.

4

RADIOIODAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CEA INTACTO*

Helena OKADA, Iracelia Torres de Toledo e SOUZA,
Constancia Pagano Gonçalves da SILVA

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR-SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05499 - São Paulo - Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo é a análise de um sistema adequado para a iodação de anticorpos monoclonais, rápido, simples, eficiente e reprodutivo, próprio aos laboratórios radiofarmacêuticos. É importante lembrar que os anticorpos são moléculas bioquímicas sensíveis, sujeitas durante a iodação à perda da atividade que é essencial ao seu modo de ação, especialmente a habilidade de ligação específica ao antígeno.

O advento de agentes de iodação em fase sólida, conduziu a uma série de técnicas de iodação, branda, útil para marcação de material biológico sensível. O agente mais largamente usado é o Iodogen (1,3,4,6 tetracloro 3a,6a difenilglicoluril).

Anti-CEA 4C IgG_{2a,k} (preparado no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer-São Paulo-Brasil) é usado, após a purificação em Proteína A-Sepharose, como modelo para avaliar a metodologia do Iodogen.

Elaborou-se um sistema de cromatografia miniaturizada também rápido, simples, eficiente para determinar a eficiência de marcação, incorporação do iodo na imunoglobulina e a pureza radioquímica do ¹³¹I-anti-CEA.

(*) Trabalho apresentado no 5th Congress - World Federation of Nuclear Medicine & Biologia, Montreal-Canadá, de 26 a 31 de agosto de 1990.

INTRODUÇÃO

A introdução da tecnologia de anticorpos monoclonais e o desenvolvimento de métodos alternativos de radioiodação de proteína acelerou o uso desses anticorpos como radioimunofármacos em Medicina Nuclear.

Nestes últimos 20 anos a tecnologia de radioiodação de proteínas passou por modificações consideráveis objetivando o desenvolvimento de método de marcação de proteína com a manutenção da integridade bioquímica da molécula protéica.

A extrema sensibilidade dos procedimentos radioisotópicos é essencial para a detecção das pequenas quantidades de antígenos presentes na complexa mistura biológica.

A radioiodação, envolvendo agentes oxidantes, é o método mais comum para marcação de proteína mas apresenta a desvantagem de, ocasionalmente, danificar a proteína resultando na destruição de determinantes antigênicos ou outra atividade biológica.

O uso *in vivo* de anticorpos monoclonais radioiodados como radioimunofármacos no diagnóstico e terapia de tumor, e o fato de serem estes reagentes facilmente danificados pela radioiodação torna necessário a padronização de um método de radioiodação, eficiente, tecnicamente simples, brando, reproduzível, enfim um método apropriado à marcação de biomoléculas sensíveis como o método do Iodogen (Fraker & Speck, 1978; Salacinsky e col., 1981). O Iodogen, 1,3,4,6 tetracloro 3a,6a difenilglicoluril (Pierce Chemicals), composto insolúvel na água, foi primeiramente descrito por Fraker & Speck em 1978 como agente de iodação em fase sólida para marcação de proteína. O Iodogen, pela natureza hidrofóbica, mantém-se imobilizado na base do tubo de reação, durante a iodação, minimizando a exposição direta da proteína ao agente oxidante diminuindo, conseqüentemente, o dano à proteína.

Iniciamos nossos estudos com a purificação da molécula de imunoglobulina (anticorpo monoclonal anti-CEA 4C¹¹ da classe IgG_{2a,k}, contido no fluido ascítico de camundongo BALB/c isogênico imunizado com CEA-antígeno carcinoembrionário - gentilmente cedido pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer-São Paulo-Brasil) por afinidade cromatográfica em Proteína A-Sepharose. Proteína A é uma proteína produzida pela maioria das linhagens de *Staphylococcus aureus* (Staphylococcal Proteína A) acoplada a Sepharose.

Se o anticorpo monoclonal (imunoglobulina IgG) é de uma classe que se liga à Proteína A (IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃) a afinidade cromatográfica em Proteína A-Sepharose, pela sua disponibilidade comercial (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala-Sweden), alta capacidade de ligação e condições brandas de eluição é método de escolha para a purificação de imunoglobulinas.

Cinco mililitros do gel intumescido (1,5g seco) é capaz de ligar 100-125mg de IgG. As condições de eluição da IgG ligada à Proteína

na A dependem da subclasse de IgG.

Para a radioiodação do anti-CEA 4C₁₁ da classe IgG_{2a} purificado em Proteína A-Sepharose utilizamos o método do Iodogen. Investigamos também os procedimentos de cromatografia miniaturizada (Colombeti & col., 1976; Zimmer & col., 1978) de baixo custo e de avaliação rápida, exato e reproduzível. A vantagem deste método está no fato das impurezas moverem-se com a frente do solvente (Rf 0,8-1,0) enquanto que o radiofármaco permanece próximo a origem (Rf 0,0-0,3 ou vice-versa). Isto permite cortar a fita ao meio (Rf 0,5) e ensaiar os dois segmentos para determinar o nível de impureza radioquímica na preparação.

Utilizando sistemas de papel e solvente específico é possível quantificar os componentes radioquímicos dentro do radiofármaco com base na migração perceptível ao longo do cromatograma.

MATERIAL E MÉTODOS

Para estes estudos usa-se sempre o anticorpo monoclonal anti-CEA 4C₁₁, imunoglobulina da classe IgG_{2a,k} doado pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer.

1. Purificação do anti-CEA

1.1. Preparo da coluna de purificação

A coluna de Proteína A-Sepharose é preparada de acordo com Ey & col., 1978. Intumescce-se 1,5g de Proteína A-Sepharose em 5ml de PBS (tampão fosfato-salina) 10mM, pH 8,0. A Proteína A-Sepharose intumescida é empacotada em pipeta de vidro de 10ml.

Antes do uso a coluna é lavada com tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, pH 4,5 para remoção de algum material imprecisamente ligado. A seguir a coluna é equilibrada com tampão fosfato 0,1M, pH 8,0.

1.2. Preparo do fluido ascítico

O fluido ascítico é diluído em PBS 10mM, pH 8,0 (2:1, v/v). Verifica-se o pH 8,0. Um ml do filtrado de ascite é aplicado à coluna de Proteína A-Sepharose. Lava-se a coluna com tampão fosfato 0,1M, pH 8,0. O efluente da coluna é monitorado em 280nm por monitor de fluxo Uvicord LKB e registrador até a absorbância a 280nm retornar à linha basal.

Para a eluição do anticorpo, subclase IgG_{2a} usa-se como efluente o tampão citrato-ácido cítrico 0,1M, pH 4,5. O efluente da coluna é monitorado até que a absorbância em 280nm retorne à linha basal.

A razão do fluxo é de 0,46ml por minuto. Coletam-se frações de 3,0ml. A denaturação da IgG_{2a} é minimizada por adição de 0,65 ml de Tris-HCl 1M, pH 9,0 a cada tubo para garantir a neutralização das frações coletadas. Após o uso, a coluna é reequilibrada com tampão fosfato 1M, pH 8,0.

A coluna pode ser usada repetidamente (40-50 vezes) sem deterioração ou troca nas propriedades de ligação.

2. Radioiodação do anti-CEA: Iodogen

A radioiodação de anticorpos monoclonais envolve, em geral, os mesmos princípios e procedimentos aplicados a proteínas. Escolhem-se as condições de reação baseando-se na eficiência e na concentração do anticorpo.

O Iodogen (1mg) é dissolvido em diclorometano para concentração 0,1mg/ml. Desta solução 100ul (10ug) são pipetados nos tubos de reação. A remoção do solvente, por simples evaporação, resulta na formação de um fino filme na base do tubo. Esses tubos, assim revestidos, são preparados com antecedência e estocados por um período de até um ano em dessecador a -20°C .

A iodação da imunoglobulina é desenvolvida por simples adição de ^{131}I seguido pela imunoglobulina nas quantidades adequadas para a atividade específica desejada. O tempo de reação é tipicamente de 10 minutos a temperatura ambiente. A reação é encerrada por simples remoção do conteúdo do tubo.

A preparação é aplicada a uma coluna de resina de troca iônica Dowex X1-X8, 100-200 mesh, forma cloreto para a purificação.

2.1. Iodação

No tubo de reação revestido com 10ug de Iodogen, preparado previamente, os reagentes são adicionados como se segue: 40ul de tampão fosfato 0,5M, pH 7,5, 10ul de ^{131}I (2mCi) e 20ul de anti-CEA (37ug). A reação é processada em 10 minutos à temperatura ambiente e encerrada com a adição de 300ul de tampão fosfato 0,05M, pH 7,5. Separam-se alíquotas para a determinação da eficiência de marcação (percentual de ^{131}I incorporado à molécula) por um sistema de cromatografia miniaturizada. O conteúdo do tubo de reação é aplicado a coluna preparada com resina de troca iônica Dowex X1-X8, 100-200 mesh, forma cloreto (Bio-Rad) para a remoção do ^{131}I que não reagiu.

2.2. Preparo da coluna de resina de troca iônica Dowex X1-X8 (Wong & col., 1988)

A purificação é razoavelmente simples. O conteúdo do tubo de iodação é aplicado em uma pequena coluna de resina de troca iônica (seringa de 1ml de plástico descartável preenchida com a resina previamente tratada). Lava-se a coluna com 40ml de tampão fosfato 0,125M, pH 7,5 e então carrega-se com 25mg de albumina humana dissolvida em pequeno volume de solução fisiológica. Lava-se novamente a coluna com 40ml de tampão fosfato 0,125M, pH 7,5 para a remoção do excesso de albumina que não se adsorveu com alta afinidade à resina de troca iônica. Esta coluna não pode tornar-se seca durante a lavagem, antes e durante o processo de purificação.

O produto obtido na iodação do anti-CEA é aplicado à coluna. O ^{131}I -anti-CEA é eluído com tampão fosfato 0,125M, pH 7,5. O primeiro eluato (1ml) corresponde ao ^{131}I -anti-CEA puro e é estocado a 4°C por duas semanas para ensaios futuros.

Determina-se a pureza da preparação por um sistema de cromatografia miniaturizada.

2.3. Sistema de cromatografia miniaturizada

O solvente ótimo para a determinação é escolhido em primeiro lugar.

Solvente: A seleção do solvente para a separação é quase que inteiramente um procedimento empírico. Na maioria dos casos o solvente consiste de um líquido orgânico contendo água. Em muitos casos também pode ser um ácido como ácido clorídrico ou um sal.

Suporte: O papel Whatman 3MM tem-se mostrado um excelente papel cromatográfico. A razão do fluxo resulta em rápida mas adequada separação.

Para o desenvolvimento do método utiliza-se papel Whatman 3MM (1cmx6,5cm) como suporte e 3 solventes diferentes (TCA 10%, metanol 85% e solução fisiológica).

Aplicam-se as amostras na origem (1cm da base do papel). As fitas são colocadas em recipientes contendo 1ml de cada solvente. O cromatograma é desenvolvido para uma distância de 5cm. Esse percurso é alcançado ao redor de 10 minutos. As fitas são removidas, secas e cortadas ao meio (seção 1 e seção 2) entre a origem e a frente do solvente e cada seção contada no contador gama de poço (well type scintillation counter-ANSR Gamma Counter, ABBOT Lab.) com uma janela de 200-500KeV. A atividade de cada seção é comparada com a atividade total da fita. A imunoglobulina é precipitada na origem e o ^{131}I livre cromatografado com a frente do solvente.

RESULTADOS

1. Perfil de eluição (DO_{280}) de IgG_{2a} do fluido ascítico de camundongo BALB/c

Observa-se na Fig. 1 o perfil de eluição monitorado no comprimento de onda 280nm (DO_{280}) de 1ml do fluido ascítico, previamente tratado, aplicado à coluna de Proteína A-Sepharose, fluxo de 0,46 ml/min e frações coletadas de 3,9ml. Em pH 8,0 observa-se um pico único de proteína. A IgG_{2a} retida na coluna é eluída em pH 4,5.

2. Determinação da concentração de anti-CEA

A concentração da imunoglobulina purificada é determinada por espectrofotometria, medindo-se a densidade óptica no comprimento de onda 280nm e assumindo um coeficiente de extinção (1% , p/v;

1 cm) de 14 (Tabela 1).

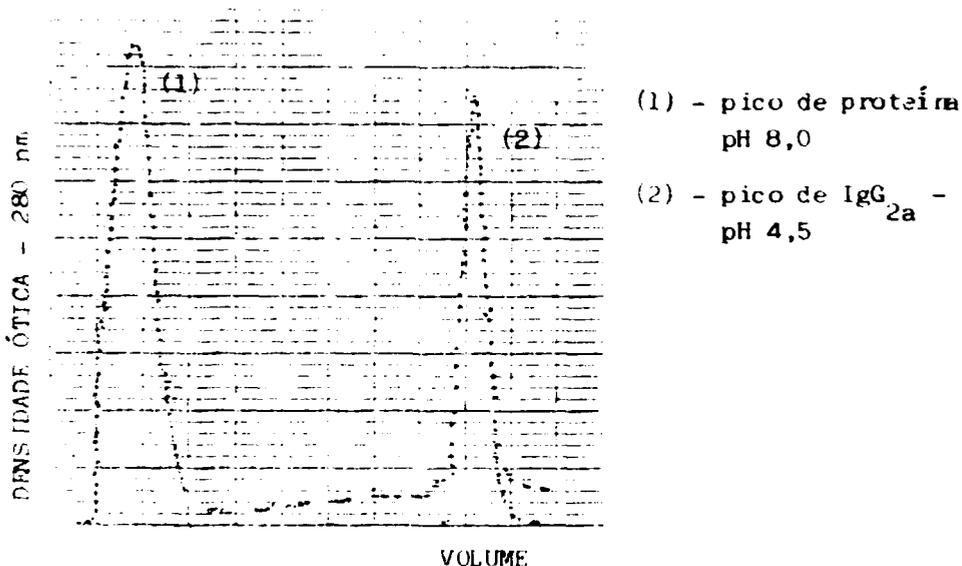


Fig.1-Perfil de eluição (DO_{280}) do anti-CEA $4C_{11}$ $IgG_{2a,k}$

Tabela 1

CONCENTRAÇÃO DE ANTI-CEA

Efluentes nº	Absorbância (DO_{280}) A	Concentração mg/ml
1	1,098	0,78
2	2,685	1,92
3	2,541	1,82
4	1,024	0,73

Os efluentes 2 e 3 são misturados e alíquotas de 50µl/tubo são estocadas a $-20^{\circ}C$.

3. Radioiodação

A eficiência das marcações expressa como a percentagem do total de radioatividade na molécula, determinada em duplicata por cromatografia miniaturizada é observada na Tabela 2.

4. Determinação da pureza radioquímica do ^{131}I -anti-CEA

O percentual da pureza radioquímica do ^{131}I -anti-CEA, primeiro eluato (1ml) da coluna de resina de troca iônica determinado, em duplicata, por cromatografia miniaturizada, resultou em 98% nos dois procedimentos de marcação (Tabela 3).

Tabela 2
EFICIÊNCIA DA MARCAÇÃO DO ANTI-CEA

Solventes	Marcação n° 1*		Eficiência (%)
	Contagens (cpm)		
	Seção 1	Seção 2	
TCA 10%	1 201 210	429 489	73
	1 317 470	435 814	75
Metanol 85%	1 090 320	440 399	7
	1 463 990	668 992	65
Sol.Fisioló- gica	392 758	165 397	70
	249 457	118 706	68
Marcação n° 2**			
TCA 10%	527 021	213 740	71
	468 416	198 350	70
Metanol 85%	636 233	311 591	67
	592 989	268 643	69
Sol.Fisioló- gica	599 474	328 580	65
	666 359	332 612	66

* Atividade específica 50 μ Ci/ μ g

** Atividade específica 40 μ Ci/ μ g

Tabela 3

PERCENTUAL DE PUREZA DO PRIMEIRO ELUATO DA COLUNA DE RESINA DE
TROCA IÔNICA DOWEX X1-X8 POR CROMATOGRAFIA MINIATURIZADA

Solventes	Marcação n° 1*		Pureza radioquímica (%)
	Seção 1	Seção 2	
TCA 10%	109 499	1 610	98
	123 359	1 844	98
Metanol 85%	107 507	1 523	98
	86 309	1 181	98
Sol.Fisiológica	74 270	1 442	98
	92 801	1 775	98
Marcação n° 2**			
TCA 10%	68 221	859	98
	372 898	4 654	98
Metanol 85%	2 983	78	98
	286 381	3 823	98
Sol.Fisiológica	296 089	3 088	98
	195 187	1 625	98

* Atividade específica 50 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

** Atividade específica 40 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

CONCLUSÕES

A técnica utilizada para a radioiodação do anticorpo monoclonal anti-CEA 4C₁₁ IgG_{2a,k}, após a purificação em Proteína A-Sepharose, utilizando o método do Iodogen, rápido, simples e confiável; a purificação em resina de troca iônica Dowex X1-X8; os procedimentos cromatográficos miniaturizados, já anteriormente avaliados (Souza & col., 1986, 1987), para a determinação da eficiência de marcação e pureza radioquímica do ¹³¹I-anti-CEA, apresentam a conveniência e simplicidade essenciais à Radiofarmácia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COLOMBETTI, L.G.; MOERLIEN, S.; PATE, G.C.; PINSKY, S.M. Rapid determination of oxidation state of unbound ^{99m}Tc and labeling yield in ^{99m}Tc labeled radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.*, 17:805-9, 1976.
2. EY, P.L.; PROWSE, S.J.; JENKIN, C.R. Isolation of pure IgG_1 , IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using Protein A-Sepharose. *Immunochemistry*, 15:429-36, 1978.
3. FRAKER, P.; SPECK, J. Protein and cell membrane iodination with sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6 tetrachloro 3a-6a diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Commun.*, 80:843-57, 1978.
4. SALACINSKY, R.P.; MELEAN, C.; SYKES, E.C.; CLEMENT-JONES, V.U.; LAURY, J.P. Iodination of proteins, glycoproteins and peptides using a solid-phase oxidizing agent 1,3,4,6 tetrachloro 3a-6a diphenylglycoluril (Iodogen). *Anal. Chem.*, 117:136-46, 1981.
5. SOUZA, I.T.T.; PEREIRA, N.S.; SILVA, C.P.G. Quality control procedures for iodinated radiopharmaceuticals ^{131}I -Hippuran and ^{131}I -Risa. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1986. (Publicação IPEN 97).
6. SOUZA, I.T.T.; PEREIRA, N.S. New perspectives in Medicine Nuclear. In: Peter H. Cox; E. Touya, eds. *Determination of inorganic radioiodine in ^{131}I -Rose Bengal and ^{131}I -Bromosulphthalein*. New York, Gordon and Breach Science Publishers, 1986. v.2, p. 91-102.
7. SOUZA, I.T.T.; PEREIRA, N.S. Determination of the radiochemical purity of ^{51}Cr -EDTA. São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1987. (Publicação IPEN 121).
8. ZIMMER, A.M.; PAVEL, D.G. Rapid miniaturized chromatographic control for iodinated radiopharmaceuticals. *Am. J. Pharm.*, 35:426-8, 1978.
9. WONG, Z.M.; TEARE, F.W.; BOWEN, B.M.; LIAO, S.K.; KNOK, C.S.; BOXEN, I. Comparison of the Iodogen and the microelectrochemical techniques for the radioiodination of monoclonal antibody. *Nucl. Med. Biol.*, 15:505-9, 1988.