

Informe preliminar del estudio de desarrollo marcación y estabilidad de un radiofármaco basado en el anticuerpo monoclonal anti-CD20 con ^{131}I , utilizado para la detección temprana de linfomas

Roberto Koga¹ rkoga@ipen.gob.pe, Bertha Ramos¹ bramos@ipen.gob.pe, Arturo Portilla¹ aportilla@ipen.gob.pe, Manuel Otero¹ motero@ipen.gob.pe, Luis Huatay¹ luhatay@ipen.gob.pe, Luis Gonzales¹ lgonzales@ipen.gob.pe, Jorge Herrera¹ jherrera@ipen.gob.pe, Conrado Seminario¹ cseminario@ipen.gob.pe

¹ Planta de Producción de Radioisótopos – IPEN

Resumen

Linfoma es un término general que se utiliza para describir cualquier tipo de cáncer que afecta al sistema linfático, particularmente en los ganglios linfáticos. Generalmente, se clasifican en dos grupos: Enfermedad de Hodgkin (EH) y Linfomas no Hodgkinianos (LNH). Los LNH constituyen un grupo muy heterogéneo de procesos linfoproliferativos que tienen mayor predilección que la EH por diseminarse a zonas extraganglionares. Los LNH tienen diferentes modelos de comportamiento y respuestas variables al tratamiento. El pronóstico depende del tipo histológico, la etapa y la respuesta al tratamiento. El anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-CD20 es específico para los receptores de la superficie CD-20, tras la unión del anticuerpo con el CD20 expresado en la membrana celular esta no se internaliza ni se excreta al medio circulante, por lo cual el anti-CD20 no circula en el plasma como antígeno libre, de modo que no compite por la unión al anticuerpo. Este AcMo es marcado con ^{131}I por el método de la cloramina T con dosis para diagnóstico. Teniendo una PRQ promedio de 99.37% y con una estabilidad de 60 días (>90% de PRQ).

Materiales y Métodos

1. Anticuerpo monoclonal (AcMo):

Anti-CD20 es una AcMo quimérico de murino/humano utilizado para el diagnóstico y tratamiento de pacientes con linfomas. Este reactivo fue una donación del Instituto de Investigaciones Nucleares (ININ-México).

2. Preparación de soluciones:

- Cloramina T: Pesar 10mg de Cloramina T y disolverlos en 5mL de Buffer fosfato 0.01M pH 7 (2mg/mL).
- Metadisulfito de Sodio: Pesar 10mg de metadisulfito de Sodio y disolverlo en 10mL buffer fosfato 0.01M (1mg/mL).
- Yoduro de Potasio: Pesar 10mg de Yoduro de Potasio y disolverlo en 10mL de buffer fosfato de 0.05M (1mg/mL).
- Preparar una solución “D” compuesta por Metadisulfito de Sodio y Yoduro de potasio en relación de 1:10 (1mL de Metadisulfito de Sodio y 10mL de Yoduro de Potasio).
- Prepara una solución E: Realizar una dilución de la solución “D” en relación de 1:10 (1mL de la solución D y 10mL con agua para inyectable o agua bidestilada libre de pirógenos).

3. Procedimiento de marcación:

- Colocar en un tubo ependorf 100uL (Diagnóstico) o 1000mL(Terapia) del AcMo anti-CD20 con una concentración de 10mg/mL y adicionar 50uL de buffer fosfato 0.5M pH 7.
- Adicionar 20uL(Diagnóstico) o 200uL(Terapia) de $^{131}\text{I}\text{Na}$ (296MBq o 2.96 GBq, 8mCi o 80mCi), e inmediatamente adicionarle 25uL de la solución de Cloramina T.
- Dejar reaccionar durante 1min. y 30 seg. agitando en un vórtex.
- Transcurrido el tiempo de reacción se adiciona 500 uL de la solución E y agitar unos segundos suavemente con la ayuda de un vórtex para detener la reacción de oxidación.

Nota: Antes de la purificación es importante verificar que el AcMo no esté precipitado, si lo estuviese, se debe desecharlo.

4. Preparación de las soluciones estabilizadoras:

El volumen final de la dosis para diagnóstico debe ser 10mL. Con una actividad final de 185-222 mBq (5-6mCi); anti-CD20 1mg, Polivilpirrolina (PVP) 0.5-0.6% ; maltosa 1-

2mg/mL; cloruro de sodio 0.85 a .95mg/ml; ácido ascórbico 0.9-1.3mg/mg; pH 7.

5. Control de calidad de la pureza radioquímica (PRQ):

Tomar aproximadamente 0.1ml de la molécula marcada y colocarlo en una tira de papel Whatman nº1, con la muestra sujeta con un gancho de jebe dentro de la probeta, dejando correr que contiene con fase móvil una solución de metanol al 85% dejando correr por toda la tira hasta alcanzar una altura adecuada (como mínimo 10 cm.).

Alcanzada la altura, sacar las tiras y colocarlas sobre papel absorbente y llevar a secar al ambiente 15 a 20 minutos. Una vez secas las tiras son llevadas a contar a un equipo contador de pozo.

Se procede a cortar con la ayuda de una tijera y una pinza, se coloca dentro de unos tubos de plásticos que a su vez estos tubos van dentro de un rak, colocarlo dentro del equipo contador automático Wizzard Wallac, que previamente está calibrado para contar I^{131}

Cromatografía Ascendente

SOPORTE	Whantman Nº 1
SOLVENTE	Metanol 85%
Rf I^{131} -AcMo	1,0
Rf I^{131}	10,0

La Pureza Radioquímica > 90%

6. Resultados

Se realizaron tres lotes experimentales con la finalidad de establecer una metodología de marcación del anti-CD20 con el I^{131} , que es producido en la Planta de Producción de Radioisótopos del IPEN.

Obteniendo un promedio de PRQ (porcentaje de pureza radioquímica) del 99.37%, ver tabla nº1, con una actividad de 5mCi por lote de producción (dosis para diagnóstico), al radiofármaco obtenido se le agrega las soluciones estabilizantes y es filtrada a través de un filtro esterilizante marca millipore de 0.22 micrómetros para eliminar las impurezas. Luego de ser filtrado y colocado dentro de un vial estéril, libre de pirógenos, sellado y colocado dentro de un blindaje de plomo y almacena entre 4 a 8°C.

A este radiofármaco se procede a realizar los ensayos de estabilidad, el cual consiste conocer en que periodo de tiempo el I^{131} se desliga con anti-CD20 hasta una PRQ <90%; Obteniendo como resultado que el anti-CD20

se mantiene unido 40 días con una PRQ >95% y 60 días > 90% (Figura 1)

Tabla 1. Resumen de la PRQ por Lotes.

Lote de Producción	PRQ
Lote nº1	99.01%
Lote nº2	99.58
Lote nº3	99.52
Promedio	99.37±0.003

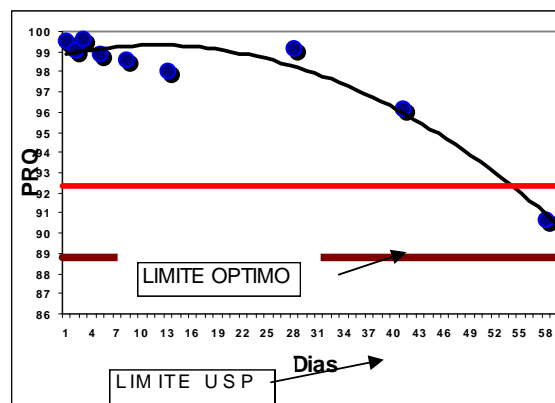


Figura 1. Estudio de estabilidad de anti-CD20 + I^{131} marcado con dosis de diagnóstico.

7. Discusión

Los anticuerpos monoclonales constituyen el primer ejemplo de una terapia exitosa para el tratamiento de linfomas a partir de los conocimientos adquiridos del sistema inmunológico. Cada linfoma es un clon de células idénticas que presentan la misma inmunoglobulina en la superficie. Centrándose los estudios en el antígeno CD20, ya que se encuentra expresado en el 95% de los linfomas de células B [6].

Por esta razón, en laboratorio se creó el anti-CD20 que es un anticuerpo monoclonal murino/humano específico para los receptores de superficie CD20 de los linfocitos B humanos. La unión este antígeno con el anticuerpo también induce a la apoptosis o muerte celular.

Al radiomarcarse este anti-CD20 con un radionucleído emisor B como es el caso del I^{131} , tiene como primer objetivo ayudar a eliminar las células oncogénicas causantes de esta enfermedad y aprovechando la emisión de fotones de este radionucleído obtener imágenes de su biodistribución en función del tiempo en el paciente.

Es por ello que en este trabajo de desarrollo fue la marcación del anti-CD20 con el I^{131} utilizando el método de Cloramina T,

purificando en una columna PD10 obteniendo un producto con un porcentaje de pureza radioquímica (PRQ) promedio de 99.37% siendo un porcentaje de pureza muy similar a los obtenidos por Nevares[5]. que obtuvo un PRQ del 98%.

Con respecto a los controles de estabilidad nuestro producto se mantuvo por encima 95% hasta los 40 días post-marcación, con este dato obtenido podemos concluir que esta molécula marcada se mantiene estable, pudiendo ser utilizado para estudios de diagnóstico. Más no para tratamientos radioinmunoterapéuticos, (RIT) ya que para el tratamiento de esta enfermedad se recomienda utilizar un producto que tenga una PRQ mayor al 97%, para un RIT se utiliza dosis radiactivas altas, es por ello que mientras más impuro sea el producto mayor probabilidad que irradie otros órganos que o estén comprometidos.

Otra ventajas importantes de marcar este anticuerpo monoclonal con el ^{131}I , es fundamentalmente su bajo costo, a su baja emisión de energía B, es útil para masas tumorales pequeñas y aprovechando a la emisión de energía gamma, se puede obtener imágenes y realizar estudios de su distribución en el organismos para realizar sus cálculos de dosimetría.

Agradecimiento

A la Dra. Guillermina Ferro Flores del Instituto Nacional de Investigaciones (ININ) México, quien gracias a sus conocimientos y esfuerzo fue la que elaboró el protocolo de marcación del anti-CD20 con ^{131}I y ^{188}Re y nos proporcionó el insumo para realizar los ensayos.

8. Referencias

1. Bellas C. Linfoma Hodgkin. Rev. Esp. Patol. 2004; 37(2):129-138.
2. C. Friesen, A. Lubatschofki, J. Buchmann S. Reske, Debatin K. *Beta-irradiation used for systemic radioimmunotherapy induces apoptosis and activate apoptosis pathways in leukaemia cells.* Eur.J. Nucl. Med. Med. Imaging. 2003; 30:1251-1261.
3. Ferro G. y col. ARCAL LII - OIEA *Manual de Preparación, control de calidad de los Radiofármacos ^{188}Re -antiCD20 y ^{131}I -anti CD20 para el tratamiento de Linfomas.* 2004.
4. Hernández M, Knox S. Ind. J. Radiation Oncology Biol. Phy. 2004; 59(5):1274-1287.
5. Nevares N, Zapata A, Crudo J. *^{131}I -anti CD20 para el tratamiento de linfomas: preparación y control de calidad.* Alasbinm Journal. 2006 January; 8(31).
6. Vose JM. *Inmunoterapia en el Linfoma No Hodgkin.* Sociedad Iberoamericana de información Científica (SIIC), 2003. www.siisalud.com