# $^{90}$Y-Markierung von anti-CD20 Antikörpern: Synthese, Kopplung und radioaktive Markierung

J. Brockmann, S. Maus, M. Jennewein, F. Rösch
Institut für Kernchemie, Universität Mainz

## Einleitung

Das Therapieprinzip der Radio-Immuno-Therapie (RIT) spielt bei der Behandlung von verschiedenen onkologischen Erkrankungen eine immer größere Rolle, da hierbei gleichzeitig verschiedene Therapiestrategien miteinander verbunden werden. Die Wirksamkeit von speziell gegen den Tumor gerichteten monoklonalen Antikörpern (mAk) kann durch die lokoregionäre Bestrahlung des Tumors bei einem vergleichsweise günstigem Toxizitätsprofil durch die Konjugation an geeignete Radionuklide potenziert werden.

Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) finden sich auf Platz 6 der durch Neoplasien verursachten Todesfälle. Für die Therapie von B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) wird der Einsatz von $^{90}$Yttrium-markierten, humanisierten anti-CD20-mAk IDEC-C2B8 (Rituximab®) diskutiert.

Prinzipiell ist für die Markierung von Antikörpern mit $^{90}$Y die Verwendung von Komplexbildnern erforderlich. Hier werden vor allem Derivate des DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) und DOTA (Tetraazacyclododekantetraessigsäure) verwendet. Da die biologische Halbwertszeit großer Proteine entsprechend lang ist, sollte der anti-CD20 Antikörper mit dem inerten DOTA-Komplex gekoppelt und anschließend mit $^{90}$Y markiert werden.

Für die Kopplung und die radioaktive $^{90}$Y-Markierung von anti-CD20 über p-SCN-Bz-DOTA-Derivate sollten optimale Reaktionsbedingungen gefunden werden [1].

## Antikörperreinigung

500 µl einer CD20 Stammlösung (10 mg/ml) werden über einen Zentrifugenfilter (Molausschlußgröße 20.000) filtriert und 3mal mit je 500 µl $NaH_2PO_4$ (c=0.1 mol/l) gewaschen und anschließend in 500 µl $NaH_2PO_4$-Puffer aufgenommen.

## Darstellung von p-SCN-Bz-DOTA

Die Darstellung der SCN-Derivate erfolgt ausgehend von den p-$NO_2$-phenyl- über p-$NH_2$-phenyl-Verbindungen und finaler Umsetzung mit Thiophosgen (Abb.1).

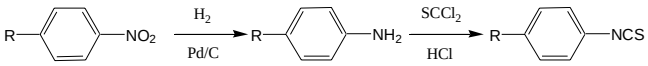
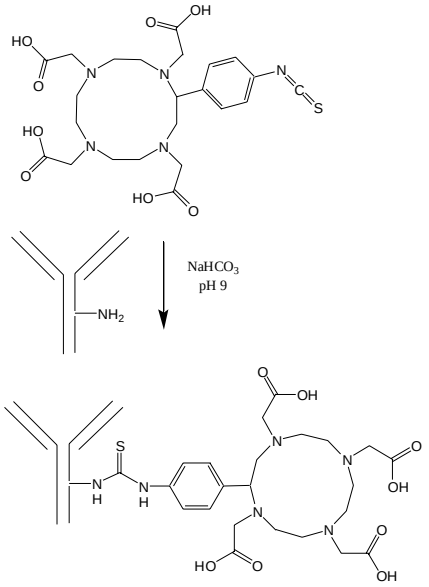



Abb.1 : Darstellung von p-SCN-Bz-DOTA-Derivaten ausgehend von p-$NO_2$-Bz-DOTA

Hierzu werden 50 mg p-$NO_2$-Bz-DOTA in 10 ml MeOH/$H_2O$ gelöst und 3 h mit $H_2$/Pd/C hydriert. Anschließend wird filtriert, vom Lösemittel befreit und in 3 ml 3 N HCl aufgenommen. Nach Zugabe von 700 µl $CHCl_3$ werden 300 µl einer 90%igen $SCCl_2$/Ether-Lösung zugegeben und 4 h bei RT gerührt. Anschließend wird 5mal mit je 1 ml $CHCl_3$ ausgeschüttelt, die wäßrige Phase eingeengt und in 1 ml 0.1 M HCl aufgenommen.

Die anschließende Konjugation des p-SCN-Bz-DOTA-Derivates erfolgt über die Bindung von ε-Aminfunktionen der




Lysine des verwendeten Antikörpers mit der Isothiocyanat-Gruppe (SCN) des Komplexbildners (Abb.2).

Abb. 2 : Kopplungsreaktion p-SCN-BZ-DOTA mit anti-CD20

Für die Kopplungsreaktion wurden verschiedene Puffergemische (0.1 M $Na_2HPO_4$, 0.01 M $NaHCO_3$, 0.1 M $NaHCO_3$), und Stöchiometrien (Massenverhältnis SCN-DOTA/Antikörper: 0,28; 0,56; 1,12; 2,8) evaluiert.

Eine Überprüfung der Kopplungsausbeute erfolgte durch radioaktive Markierung mit $^{90}$Y.

Die Reinigung der gebildeten Antikörperkonjugate erfolgt durch Ultrazentrifugation an Filtermaterialien geeigneter Porengröße. Radiomarkierungen mit $^{90}$Y wurden in 0.1 M $NH_4OAc$ Lösung durchgeführt. Die radiochemische Ausbeute wurde mittels Gelausschlußchromatographie (HPLC) bestimmt. Niedermolekulare Verunreinigungen werden abschließend durch Ultrazentrifugation beseitigt.

## Ergebnisse

Für die Darstellung von $^{90}$Y-markierten DOTA-anti-CD20-Antikörpern erwies sich ein p-SCN-Bz-DOTA/anti-CD20-Masssen-Verhältnis von 1,12 als ausreichend um eine 90%ige Markierung mit $^{90}$Y zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang lieferte eine Kopplungsreaktion, die in 0.1 M $NaHCO_3$-Lösung durchgeführt wurde, die besten Ausbeuten.

Kinetische Untersuchungen zur $^{90}$Y-Markierung in Puffersystemen ergaben für einen 0.1 M $NH_4OAc$-Puffer bei Raumtemperatur Ausbeuten von 90% nach 24 Stunden. In analogen Ansätzen mit Antikörpern konnte für diese Reaktionsführungansatz eine Erhaltung der Immunoreaktivität nachgewiesen werden.

Markierungsausbeuten und -Kinetiken konnten bei höheren p-SCN-Bz-DOTA/anti-CD20-Massen-Verhältnissen zwar ge-

steigert werden, müssen jedoch hinsichtlich der Immunoraktivität der $^{90}$Y-DOTA-CD20-Derivate überprüft werden.

[1] McMurry T.J., Brechbiel M.W., Kumar K., Gansow O., Bioconjugate Chem. 3 (1991), 108-117