

⁶⁸Ga-Markierung von neuen tumorspezifischen Antikörpern

B. Sandhöfer¹, T.L. Ross¹, U. Sahin², F. Rösch¹

¹Institut für Kernchemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

²Translationale Onkologie (TRON), Universitätsmedizin Mainz

Einleitung: Die Einrichtung TRON (Translationale Onkologie) in Mainz beschäftigt sich unter anderem mit der Erforschung, Entwicklung und Produktion von hochspezifischen onkologisch wirksamen Strukturen und Molekülen. Darunter fallen z.B. auch Antikörper, die durch die Firma Ganymed in Mainz hergestellt werden. Diese Antikörper besitzen eine exzellente Spezifität. Sie binden fast ausschließlich an Tumorzellen des gastrointestinalen Gewebes und verursachen somit keine Kreuzreaktionen mit anderen gesunden Zellen. Damit erfüllt der Antikörper mit all seiner Zell-tötenden Wirkung oder besser gesagt auch sein Target die Kriterien eines *magic bullet*. Um den Antikörper schnellstmöglich zur klinischen Anwendung bringen zu können, ist eine *in vivo*-Evaluierung auf Basis der PET (Positronen-Emissions-Tomographie) geplant.

Methoden: Es wurden erste Markierungsversuche unternommen. Dabei kam das Radiometall ⁶⁸Ga zu Einsatz. Das relativ kurzlebige (68min) Radionuklid, dessen Halbwertszeit für ein *in vivo*-Imaging von Antikörpern leider zu kurz ist, kann für die Evaluierung der Markierungsmethodik und für *in vitro*-Affinitätsstudien an *target*-tragenden Zellen herangezogen werden. Später sind dann Radiomarkierungen mit ⁹⁰Nb (14,6h) geplant, womit auch *in vivo*-Untersuchungen mit einem größeren Zeitfenster möglich sein werden

Für die Markierung mit Radiometallen wie ⁶⁸Ga wird der Antikörper zunächst mit einem Chelator, in diesem Fall mit DFO (Deferoxamin) konjugiert. Die zugrunde liegende Konjugationschemie ist die der NCS-Kupplung, die es erlaubt, den Chelator an, im Antikörper statistisch verteilte, Lysin-Seitenketten zu binden. Dazu wurde der Antikörper bei pH 9 mit max. zehnfachem Überschuss an Df-Bz-NCS als 10 mM Lösung (DMSO) versetzt und für 30 min bei 37 °C gerührt oder geschüttelt. Anschließend wurde mittels Größenausschluss (PD10 *desalting columns*) der Antikörper von nicht umgesetztem Chelator abgetrennt und in Acetatpuffer (pH 5) eluiert, womit direkt Markierungsbedingungen geschaffen wurden. Abbildung 1 zeigt schematisch das beschriebene Vorgehen.

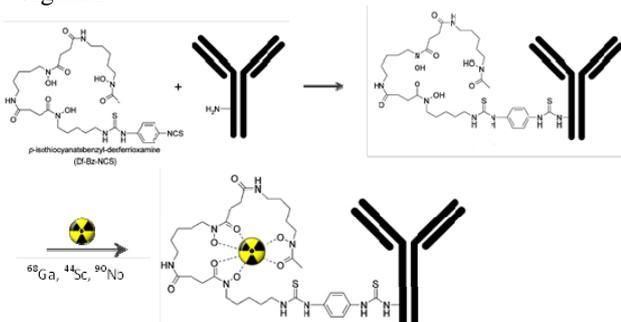


Abb. 1: Antikörper-Konjugation und -Radiomarkierung

Zur Markierung mit ⁶⁸Ga wurde das Radionuklid-generatoreluat (kationische Aufarbeitung) bei 95 °C eingedampft, in Acetatpuffer pH 5 suspendiert und dem Antikörper (25 µg – 1 mg) in 800 µl des gleichen Puffers zugegeben. Die radiochemische Ausbeute wurde mittels HPLC bestimmt.

Ergebnisse: Je nach eingesetztem Überschuss an DFO-Chelator konnten bei einem Labeling mit 50 MBq ⁶⁸Ga schon bei 25 µg (8x DFO), 50 µg (5x DFO) und 125 µg (4x DFO) nahezu quantitatives Labeling erzielt werden. Abbildung 2 zeigt die sukzessive Zunahme der Markierungsausbeute eines des Antikörpers bei vierfachem DFO-Überschuss.

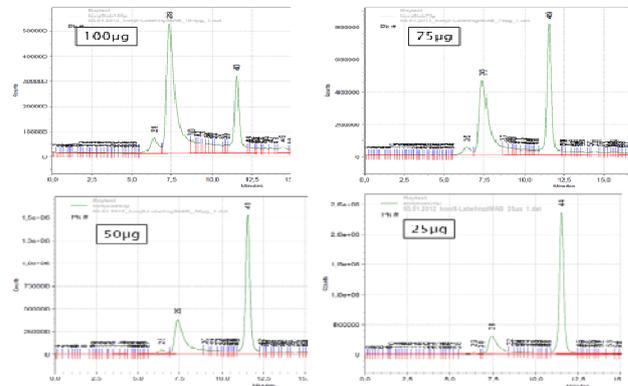


Abb. 2: Radio-HPLC-Chromatogramme der Markierungsansätze mit je 50MBq ⁶⁸Ga und 25-100 µg. Retentionszeit: 7min (Antikörper), 12min (⁶⁸Ga).

Da durch Größenausschluss via HPLC kann keine Aussage über die Integrität eines Proteins wiedergegeben werden und die Massenauflösung ist eingeschränkt, wurde zum Nachweis des Labelings und des Strukturerhalts des Antikörpers eine SDS-Page mit dem unveränderten Antikörper und dem radioaktiv markierten Antikörper durchgeführt. Es folgte eine Coomassie-Färbung und eine Autoradiographie. Abb. 3 zeigt, dass die Bande des 150 kDa-Antikörpers auch die Aktivität trägt, womit gezeigt ist, dass eine selektive und milde Markierung erreicht wurde.

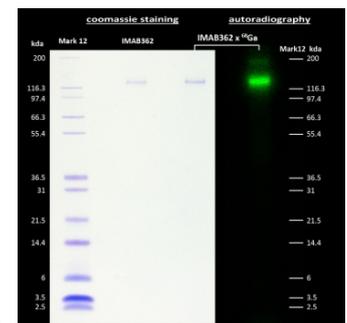


Abb. 3: SDS-Page mit Referenzantikörper und ⁶⁸Ga-markiertem Analoga.

Acknowledgments

Die Autoren danken der Firma Ganymed für die Bereitstellung des Antikörpers.