

¹¹¹In-mærkning af anti-MUC₁-DTPA

Påvisning af MUC₁-positive lymfeknudemetastaser fra mammae cancer

Bachelorprojektet er udført i 2009 på Klinik for Klinisk Fysiologi, Nuklearmedicin og PET, Rigshospitalet og Panum Institutet i samarbejde med: **Inge Buch**, hovedvejleder. Lektor ved Bioanalytikeruddannelsen, Professionshøjskolen Metropol // **Linda Kragh**, klinisk vejleder, RH. // **Annette Chakera**, læge, RH // **Birger Hesse**, overlæge, RH. // **Amarnadh Nalla**, ph.d.-stud., KU.

Artiklen er skrevet på baggrund af et professionsbachelorprojekt udført af Kim Ryder Jensen og Håkon Schulze Romme. Artiklen belyser projektets udførelse og resultater, men er også en beskrivelse af, hvordan et bachelorprojekt kan udføres, og hvilke problemer der kan opstå.

Formålet med projektet var at udføre mærkning af DTPA-konjugeret anti-MUC₁ med ¹¹¹In. Antistofkomplekset skulle kunne påvise metastaser i lymfeknuder, hvortil mammae cancer havde metastaseret sig. Den radiokemiske renhed af komplekset skulle være så høj, at det muliggjorde visualisering af sporstofet med gammakamera og billeddannelse eller via probe for herefter at teste specificiteten af anti-MUC₁-DTPA-¹¹¹In over for beads, celler og in vivo, med anti-TNP-DTPA-¹¹¹In som kontrol.

Vi kunne opnå en radiokemisk renhed på over 90 % ved mærkning af anti-MUC₁-DTPA og anti-TNP-DTPA med ¹¹¹In. Dermed konkluderede vi, at vi kunne bruge antistofferne til beads og cellebindingsanalyse. Testen af specificitet over for beads var ikke overbevisende. Men cellebindingsanalysen gav, at anti-MUC₁-DTPA-¹¹¹In bandt 180 % mere end anti-TNP-DTPA-¹¹¹In til cellerne.

Baggrund

De seneste år er der sket en stigning i antallet af mammae cancer tilfælde i Danmark. Der oplyses om 4.200 nye tilfælde pr. år. Dette gør mammae cancer til den hyppigste kræftform hos kvinder. Mammae cancer kan opstå ved mangel på eller overekspression af tre forskellige receptorer: østrogen-, progesteron- og HER2-receptorer (triple receptortest).

Ved en variant af mammae cancer savnes disse receptorer. Denne form af mammae cancer kan være særdeles aggressiv og metastaserer nemt. Nyere forskning af Joseph Baar et al.(1) viser, at 92 % af disse tilfælde indeholder MUC₁-receptorer. Desuden udtrykker 90 % af samtlige mammae cancer tilfælde MUC₁-receptorer. Derfor er det klinisk relevant at fremstille antistoffer med høj affinitet til MUC₁.



Af bioanalytikerne // **Kim Ryder Jensen og Håkon Schulze Romme**
Nuklearmedicinsk
Afsnit, Gentofte
Hospital

Påvisning af maligne skildvagtlymfeknuder

Når en patient har fået diagnosen mammae cancer, kan patienten gennemgå en præoperativ undersøgelse kaldet Sentinel node. Undersøgelsen påviser placeringen af skildvagtlymfeknuder (SN) i vævet, men kan ikke påvise malignitet. SN er den/de lymfeknuder, der først modtager lymfe fra et område, hvori der befinder sig en tumor (se figur 1 og 2).

For at påvise metastasering til skildvagtlymfeknuden, udtages denne ved operation til frysensnit. En histologisk og immunohistokemisk undersøgelse foretages, mens patienten stadig er på operationsbordet. Påvises der malignitet i lymfeknuden, fjernes denne sammen med de øvrige lymfeknuder i regionen.

Det ville være langt mere hensigtsmæssigt, om man kunne tilrettelægge operationen med den viden på forhånd, om der var eller ikke var spredning til lymfeknuderne. Derfor ønskede vi at arbejde videre på en metode til radioaktiv mærkning af antistoffet MUC₁.

Metoden skal, ved subkutan injektion af anti-MUC₁-DTPA-¹¹¹In, påvise lymfeknuder indeholdende metastaser fra mammae cancer.

Antistof

MUC₁ i mammae cancer adskiller sig fra en normal MUC₁ ved at fraspalte en kulhydratgruppe. Denne underglycosylerede form af MUC₁ overeksponeres i adenocarcinomer, bl.a. i pancreas og urinblæren. I invasiv mammae cancer er MUC₁ overrepræsenteret ved 90 % af tilfældene (se figur 3).

TNP anvendes som kontrol ved antigen-antistof-forsøgene. Anti-TNP er et antistof, der kan binde uspecifikt til MUC₁-antigen i forhold til anti-MUC₁, der binder specifikt.

På grund af den uspecifikke binding forventes en vis aktivitet ved måling af anti-TNP.

Chelator

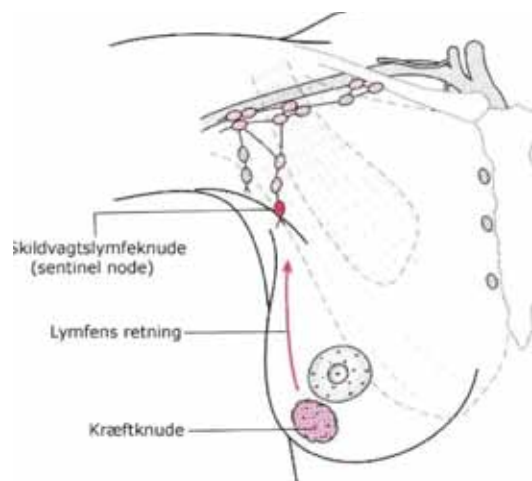
Den radioaktive isotop kan ikke bindes direkte til antistoffet. Det er nødvendigt at have et molekyle, der kan binde sig til både det radioaktive sporstof og til antistoffet, uden at antistoffet mister sin affinitet til sit specifikke antigen. Med erfaringer fra tidligere studier, blandt andre D.J. Hnatowich et al.(2) valgte vi at bruge cyklisk DTPA til konjugering af antistofferne.

Radioaktivt sporstof

Vi valgte at bruge ¹¹¹In til mærkningen af anti-MUC₁-DTPA og anti-TNP-DTPA. ¹¹¹In er særdeles velegnet til mærkning af lægemidler, herunder antistoffer. Halveringstiden for ¹¹¹In er 67,9 timer, der giver antistofferne tid nok til at binde sig til metastaserede lymfeknuder.



FIGUR 1: Lymfedrænage fra bryst til lymfekirtler.



FIGUR 2: Den eller de lymfeknuder i armhulen, som først modtager lymfevæske fra kræftknoten i brystet, kaldes skildvægtslymfeknuderne eller sentinel node.

Den forholdsvis korte halveringstid medfører, at patienten ikke udsættes for unødvendig stråling i forbindelse med indgivne dosis.

^{111}In har to energitoppe, 171 og 245 KeV. Det er muligt at kombinere ^{111}In med en anden radioaktiv isotop, hvorved der kan optages billeder med gammakamera indstillet på de forskellige energier.

Metoder

Radiokemisk renhed og ITLC

Først fremstilles det radioaktive lægemiddel og kontrolstoffet ved at tilføje ^{111}In til hhv. anti-MUC1-DTPA og anti-TNP-DTPA. Den radiokemiske renhed kontrolleres ved ITLC-kromatografi. Ved radiokemisk renhed under 90 % udføres enten en oprensning af lægemidlet eller forlænget inkubationstid. Oprensning udføres ved brug af PD10-kolonne, der retinerer partikler i størrelse svarende til frit ^{111}In (Se figur 4).

Pull down assay

Pull down assay er en immunokemisk metode, som kan påvise antistoffer i en prøve ved hjælp af beads. En bead er en sepharose kugle, der i dette tilfælde er coatet med oprenset MUC1 antigen. Begge antistoffer blev testet. Antistofferne blev inkuberet en time ved stuetemperatur. Supernatant blev separeret fra pellet ved centrifugering, hvorefter aktiviteten blev målt i en gammataæller.

Celleforsøg

Celler fra cellelinjen MCF-7 med MUC1-positive mammae cancer-celler opdyrkedes.

Cellerne blev inkuberet med hhv. anti-MUC1-DTPA- ^{111}In og anti-TNP-DTPA- ^{111}In . Supernatant og pellet blev separeret, hvorefter aktiviteten blev målt i en gammataæller.

In vivo-kontrol - kanin

^{111}In -mærket anti-MUC1 og $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -mærket Nanocoll blev injiceret subkutant i raske kaniner uden tumorer. Lægemidlernes vandring fulgtes med gammakamera.

In vivo-kontrol - mus

Anti-MUC1-DTPA- ^{111}In og anti-TNP-DTPA- ^{111}In blev injiceret intratumoralt i nøgenmus. Tumorerne indeholdt MUC1-antigen og havde størrelse tilsvarende lymfeknude. Ved scintigrafisk undersøgelse af musene på injektionstidspunktet og efter tid er det muligt at beregne retentionen af MUC1 og TNP i tumor (se figur 5).

Resultater og diskussion

Radiokemisk renhed og ITLC

Resultaterne fra målingerne af den radiokemiske renhed for ^{111}In -mærkning af anti-MUC1-DTPA og anti-TNP-DTPA, målt med ITLC, varierede meget.

En årsag til lave radiokemiske renheder kan afhænge af afpipetteringen. Antistofferne afpipetteres i så små mængder, MUC1 17 μl og TNP 13 μl , at en lille rest i pipettespidsen kan have signifikant indflydelse på koncentrationen af antistof.

Det medfører, at der er en mindre mængde antistof til at binde ^{111}In , hvilket kan medføre lavere radiokemisk renhed af hhv. anti-MUC1-DTPA- ^{111}In og anti-TNP-DTPA- ^{111}In .

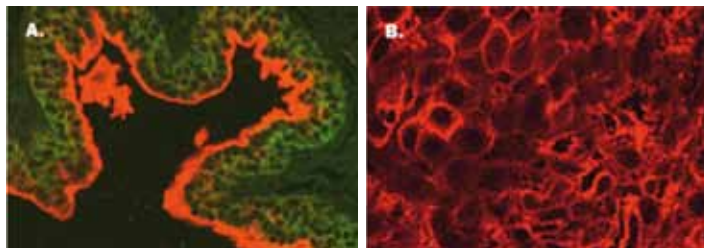
Vi så flere gange, at mærkningsprocenten blev bedre efter længere tids inkubation.

Det kan tyde på, at opblandingen ikke er optimal ved tilsætning af antistoffet eller ved tilsætning af antistoffet, eller at komponenterne ikke har haft tid nok til at reagere.

Dermed kan frit ^{111}In have reageret med citratbufferen i blandingen. D.J. Hnatowich og J. McGann(3) finder, at for høj koncentration af citratbuffer eller anden kompleksdannende komponent kan forstyrre antistof-mærkningen ved at konkurrere med DTPA om det radioaktive sporstof.

På kromatogrammet ses dette som et område med forhøjet aktivitet ud over de to sædvanlige toppe med ^{111}In -mærket antistof og frit ^{111}In (Se figur 6).

Forsøg af I. Buch, hvor citrat og ^{111}In blandes, giver en top på kromatogrammet, som stemmer overens med fraktionen i midten. Dette verificerer, at citrat kan kompleksbinde ^{111}In . Efter længere tids inkubation blev mærkningsprocenten højere. Forklaringen kan være, at DTPA har højere affinitet til ^{111}In end citrat og dermed har kunnet tiltrække de citratbundne ^{111}In -atomer.



FIGUR 3: MUC1 ekspression (markeret med rødt) i normal kirtelgang i bryst (A) og overekspression i lymfekirtel ved metastatisk mammae cancer (B)



FIGUR 5: Nøgenmus injiceres intratumoralt.



FIGUR 7: Scintigrafisk billedoptagelse af kanin.

Der diskuteredes også, hvorvidt DTPA kunne dissociere fra antistoffet. Det modsiges af D.J. Hnatowich et al. Stabilitetskonstanten for ^{111}In kompleksbundet til frit eller antistofbundet DTPA er ekstremt høj, hvilket udelukker sandsynligheden for dissociation.(4)

Vi brugte meget energi og mange forsøg på at mærke antistofferne med ^{111}In . Det lykkedes også at få en tilfredsstillende mærkningsprocent på over 90 ved ^{111}In -mærkning af anti-MUC1-DTPA.

Antistofkompleks overholder de fastlagte kvalitetskriterier og kan dermed anvendes in vivo.

Pull down assay

Resultaterne fra disse forsøg viser, at kun nogle få procent af antistofkomplekserne bandt sig til MUC1-antigenerne på beadsene.

Da vi kun havde nogle få beads at teste på, havde vi heller ikke mulighed for at lave en fortyndingsrække af antistofkomplekserne. Muligheden foreligger, at koncentrationen af antistofkompleks har været for høj i forhold til antigenerne på beads. Antigenerne er dermed blevet mættede af antistof, og det antistof, der ikke er blevet bundet, er blevet i supernatanten.

På grund af specificiteten og affiniteten var det forventeligt, at anti-MUC1-DTPA- ^{111}In ville binde til MUC1-antigenet i langt højere grad end anti-TNP-DTPA- ^{111}In .

Det viste sig, at ^{111}In -mærket anti-TNP-DTPA havde højere aktivitet bundet til beads end ^{111}In -mærket anti-MUC1-DTPA.

Beads med MUC1-antigenerne blev fremstillet specifikt til dette projekt. Der findes mange kloner af samme antigen. Det er essentielt at opformere nøjagtig den klon, der passer til det specifikke antistof. Da anti-MUC1 har høj specificitet for dets antigen, vil en udskiftning af bare én aminosyre i proteinet i klonen bevirke, at affiniteten mellem antistof og antigen bliver nedsat.

Dermed vil færre anti-MUC1 bindes til MUC1-antigenerne. Placeringen af DTPA på antistoffet kendes ikke. Desuden kan det tænkes, at mærkningen af antistofferne med ^{111}In har påvirket bindingsaffiniteten til antigenet negativt. Dermed vil der ophobes ubundne ^{111}In -mærkede antistoffer.

Det har fra laboratoriet, der har fremstillet antistofferne, ikke været muligt at teste beadsene eller antistofferne på anden vis før Pull-down- og celleforsøgene. Det vides derfor ikke med sikkerhed, om beads har antigener på overfladen, eller om antistofferne fungerer optimalt.

Derfor valgte vi at arbejde videre med celler, der indeholder MUC1-antigenet.

Celleforsøg

Resultaterne for binding af ^{111}In -mærket anti-MUC1-DTPA og anti-TNP-DTPA til cellelinjen MCF-7 viser, at antistofferne i ringe grad binder til antigenerne på cellerne. Den højeste bindingsprocent, der opnås, er 4,5. Resten af aktiviteten findes i supernatanten.

Mod forventning målt lavere binding af antistofferne til MCF-7-cellelinjen end ved Pull-down-forsøget. Derimod bandt anti-MUC1 op til 180 % mere til MCF-7 end anti-TNP. Da anti-TNP binder uspecifikt til MUC1-antigenet, og anti-MUC1 binder specifikt, burde der være betydeligt højere aktivitet for anti-MUC1 end de målte.

Ved celleforsøgene er der foretaget oprensning af de mærkede antistoffer, før cellerne udsættes for antistofferne. Oprensningen er nødvendig for at udskifte citratbufferen med DPBS, hvilket giver cellerne bedre fysiologiske betingelser. Inkubationstemperaturen er sat til 37 °C, og pH til 7,2 og 7,6.

For at afklare problemstillingen om bindingsprocessen valgte vi at ændre på antigen-antistof-forholdet og inkubationstiden.

Med mistanke om at antigenerne på cellerne var i underskud og dermed mættet, varieredes koncentrationen af tilsat antistof. Det viste sig ikke at gøre en forskel, hverken for anti-TNP-DTPA- ^{111}In eller anti-MUC1-DTPA- ^{111}In . Den største fraktion aktivitet befandt sig stadig ubundet i supernatanten og er derfor ikke et tilfredsstillende resultat.

I et sideløbende forsøg blev inkubationstiden forlænget, men havde ingen effekt på bindingsprocenten.

Scintigrafi af de anvendte celleplader sikrede, at alle MCF-7-celler var medtaget i målingerne.

Kontrolforsøg, hvor alle proteiner, det vil sige ^{111}In -mærket antistof, udfældedes, viste, at proteinerne havde 5-8 % af aktiviteten. Da ITLC-målinger af samme opløsninger gav mærkningsprocenter over 80, konkluderedes, at cellemærkningen ikke fungerede optimalt.

In vivo-forsøg - kanin

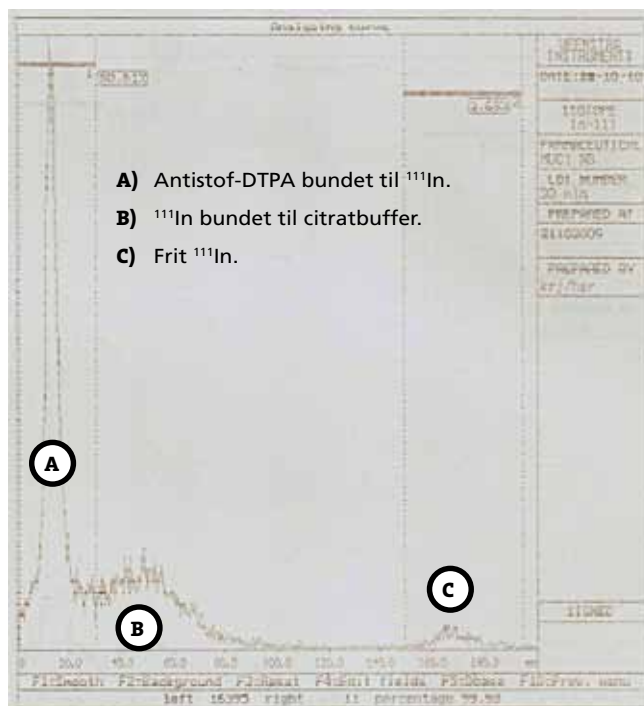
Anti-MUC1-DTPA- ^{111}In og $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocoll indgives subkutan for at transkompleksation med transferrin undgås. Ved at injicere subkutan forhindres desuden "first-pass removal" af antistoffer i leveren, og uspecifikke bindinger til andre antigener i blodsystemet undgås.

Således har vi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocoll, der viser, hvor SN er placeret, og anti-MUC1-DTPA- ^{111}In , der viser, om der er maligne celler til stede i lymfekirtlen.

Scintigrafierne viser, at både anti-MUC1-DTPA- ^{111}In og $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Nanocoll retineres i SN. Forskellen af lægemidernes udskillel-



FIGUR 4: Kim udfører oprensning af antistof.



FIGUR 6: Kromatogram med ekstra aktivitets toppe, i forhold til normal, der har to toppe, Antistof-DTPA bundet til ^{111}In og frit ^{111}In .

se i SN kunne ikke påvises med sikkerhed (se figur 7).

In vivo-forsøg - mus

Anti-MUC1-DTPA- ^{111}In og anti-TNP-DTPA- ^{111}In injiceredes intratumoralt i nøgenmus. Forhåbningen var, at MUC1 skulle binde til MUC1-antigener, og TNP udskilles af tumor.

Resultatet af forsøget viste, at udskillelsesraten var ens for begge antistoffer. Der konkluderes, at tumorerne udtrykker få MUC1-antigener.

Som nævnt tidligere kan ^{111}In -mærkningen og konjugeringen af DTPA også have påvirket bindingen af antistof-antigen ved at blokere antistoffets bindingssted.

Det er i projektet desværre ikke lykkedes at fremstille sporstof-fet, så det kan påvise malignitet i lymfeknuder.

Projektet fortsætter på Rigshospitalet, hvor man forsøger at anvende andre radioaktive isotoper til mærkning af anti-MUC1-DTPA. Artikel omhandlende det videre forløb er under udarbejdelse(5). ▣

PRIS FOR PROJEKT

Kim Ryder Jensen og Håkon Schulze Romme modtog i foråret et legat på 15.000 kroner for deres bachelorprojekt. Bioanalytikeruddannelsen ved Professionshøjskolen Metropol udleder to legater pr. semester til studerende, der har skrevet et professionsbachelorprojekt, som udmærker sig med hensyn til fagligt fokus og fagligt niveau. Legaterne er på 15.000 kroner og udbetales under forudsætning af, at de studerende omskriver deres projekt til en artikel, som publiceres.

Ordliste og referencer:

DTPA: Diethylene Triamine Pentaacetic Acid
 TNP: Trinitrophenyl
 ITLC: Instant Thin Layer Chromatography
 HER2: Human epidermal growth factor receptor 2
 DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
 ^{111}In : Indium-111
 ^{99m}Tc : Metastabilt Technesium-99

- Joseph Baar et al, MD, PhD, Director of Breast Cancer Research at the Ireland Cancer Center. [Lokaliseret d. 30. december 2009]. http://www.eurekalert.org/pub_releases/2008-12/uhocicc121208.php
- Hnatowich D.J., Layne W.W., Childs R.L., Lanteigne D., Davis M.A., Griffin T.W., Doherty P.W. *Radioactive Labeling of Antibody: A Simple and Efficient*

Method. American Association for the Advancement of Science. 1983; May: 613-615

- Hnatowich D.J., McGann J. *DTPA-Coupled Proteins – Procedures and Precautions.* Nucl. Med. Biol. Vol. 14, No. 6. 1987. 563-568.
- Hnatowich D.J., Griffin T.W., Kosciuszko C., Rusckowski M., Childs R.L., Mattis J.A., Shealy D., Doherty P.W. *Pharmacokinetics of an Indium-111-Labeled Monoclo-*

nal Antibody in Cancer Patients. J. Nucl. Med. 26. 1985. 849-858.

- Chakera A.H., Nielsen B.S., Madsen J., Romer J., Kristjansen P., Buch I., Binderup T., Ingvar C., Nalla A., Kjaer A., Hesse B.: *Immunolymphoscintigraphy for Metastatic Sentinel Nodes: Test of a Model.*: Submitted for publication.