

# <sup>111</sup>Indium-mærkning af NovoSeven-DTPA

## ORDFORKLARING

Radiokemisk renhed: Procent, der angiver andelen af den bundne radioaktive isotop. Til at vurdere den radiokemiske renhed af vores mærkning anvendes tyndlagskromatografi og kromatogram-scanner.

Artiklen er skrevet på baggrund af de tre bioanalytikers professionsbachelorprojekt fra januar 2009.

Vejledere: Projektvejleder Inge Buch, lektor ved Professionshøjskolen Metropol, og bioanalytiker samt klinisk vejleder Linda Mona Kragh, ledende bioanalytiker ved Klinik for klinisk fysiologi/nuklearmedicin, Rigshospitalet.



**Af bioanalytikerne //**  
**Camilla Sterl, Klinisk Immunologisk Afdeling, Rigshospitalet**



**Maibritt Sigvardt, Retsmedicinsk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet**



**Søren Petersen, Kennedy Centret**

For at diagnosticere blødningskilden ved en gastrointestinal blødning udfører man i dag en blødningsscintigrafi. Problemet ved denne metode er, at blødninger fra gastrointestinalkana-len typisk foregår i intervaller, da en gastrointestinal blødning medfører et blodtryksfald. Dertil kan de radioaktivt mærkede erythrocytter, som er trukket ud igennem perforeringen, flytte sig med tarmindeholdet eller de peristaltiske bevægelser, hvilket kan resultere i en uspecifik lokalisering af blødningskilden.

Novo Nordisk A/S har fremstillet en rekombinant aktiveret faktor VII (rFVIIa), NovoSeven.

NovoSeven vil ved en karlæsion binde sig til den blotlagte tissue factor (TF), som er en vævsreceptor for faktor VII. Ved at mærke NovoSeven med en radioaktiv isotop ville vi teoretisk set kunne få en betydelig mere specifik billedoptagelse til diagnosticering af gastrointestinale blødninger. Isotopen, som skal anvendes hertil, skal imidlertid opfylde følgende krav:

- være tilgængelig ved akut brug
- kunne anvendes til at mærke proteinet NovoSeven på en let-tilgængelig måde
- være velegnet til gammakamera
- have en hensigtsmæssig halveringstid
- give en acceptabel stråledosis til patienten
- ikke være for kostbart at anvende

Disse krav opfylder <sup>111</sup>Indium, der allerede anvendes hyppigt i nuklearmedicin.

## FORMÅL OG KONKLUSION

Formålet med projektet var dels at opnå en høj bindingsprocent ( $\geq 95\%$ ) mellem <sup>111</sup>Indium og NovoSeven vha. chelatoren DTPA og samtidig at reducere mængden af NovoSeven.

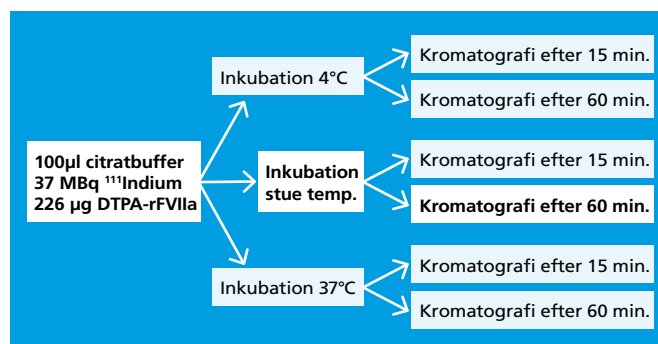
Dertil ønskede vi at optimere den eksisterende protokol med henblik på en hurtigere fremstilling af lægemidlet, afkortning af inkubationstiden og eventuel opbevaring.

Samlet set kan det konkluderes, at protokollen kan optimeres i form af en hurtigere procedure. Komplekset DTPA-NovoSeven kan opbevares i fryseren, og inkubationen kan reduceres fra de forhenværende 60 min. til 15 min. Proceduren vil fortsat være ved stuetemperatur. Dertil kan mængden af DTPA-NovoSeven, der anvendes, reduceres fra 226  $\mu\text{g}$  til ca. 45,2  $\mu\text{g}$  – altså med ca. en femtedel. Ingen af disse ændringer vil influere på den radiokemiske renhed, som stadig under disse omstændigheder kan opnås på  $\geq 95\%$ .

Dertil tyder resultater fra projektet på, at rFVIIa bedst bevarer sin biologiske aktivitet, hvis ikke det er koblet til chelatkomplekset DTPA.

**TABEL 1** INKUBATIONSFORSØG

Den fremhævede 'gren' er standarden. For at eliminere muligheden for fejl mest muligt valgte vi at lave vores forsøgsopstilling således, at så mange forsøg som muligt stammede fra den samme



## METODE

Projektets praktiske del tog udgangspunkt i en eksisterende forsøgsprotokol, hvoraf følgende forsøg udsprang: opbevaringsforsøg, inkubationsforsøg, molaritetsforsøg og pull-down forsøg.

## OPBEVARINGSFORSØG

Komplekset DTPA-rFVIIa blev modtaget færdigfremstillet og blev igennem forsøgsperioden opbevaret i fryser ved -20 °C. Stabiliteten af komplekset vurderes på baggrund af den radio-kemiske renhed af den efterfølgende <sup>111</sup>Indiummærkning.

## INKUBATIONSFORSØG

Der tages udgangspunkt i forsøgsprotokollen, som udgør en standard. Sideløbende med 'standard' laves der diverse små justeringer for at teste henholdsvis ændring i temperatur og varighed af inkubationstid.

## MOLARITETSFORSØG

Forsøgsprotokollen anvender 37 MBq <sup>111</sup>Indium til 226 µg DTPA-NovoSeven. I dette forsøg tilsatte vi gradvist mindre mængde DTPA-NovoSeven. Resten af proceduren fulgte standardprotokollen. Efter endt inkubation blev den radiokemiske renhed bestemt.

## PULL-DOWN FORSØG

For at undersøge NovoSevens biologiske aktivitet efter mærkning med <sup>111</sup>Indium udføres et pull-down forsøg. Samtidig forsøges NovoSeven mærket med <sup>111</sup>Indium uden brug af chelatoren DTPA. To forhold med høj radiokemisk renhed og lav

mængde NovoSeven blev udvalgt på baggrund af molaritetsforsøget.

Pull-down er en in vitro-metode, der har til formål at måle proteinets biologiske aktivitet. Tissue factor er koblet til Sepharose 4B og betegnes som et 'bead', denne anvendes til at binde og 'pull-down' den komponentbindende faktor, i vores tilfælde NovoSeven.

Mængden af bundet NovoSeven/tissue factor vil være et udtryk for proteinets biologiske aktivitet og fortæller noget om bevarelsen af proteinets struktur og dets funktionalitet.

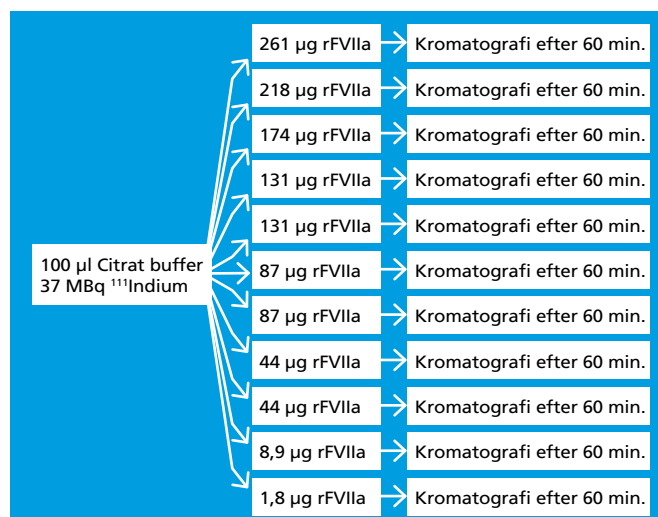
De udfald, vi kan forvente af pull-down analysen, er illustreret i figur 1, 2 og 3 (side 20).

Radioaktiviteten på henholdsvis supernatant og beads måles i en dosiskalibrator. Dertil udføres en tyndtlagskromatografi på supernatanten for at bestemme den radiokemiske renhed heri. Derved kan vi finde ud af, hvorvidt NovoSeven er biologisk aktivt, og om det stadig er koblet til vores radioaktive isotop <sup>111</sup>Indium.

## RESULTATBEHANDLING OG VURDERING

Alle resultater vil blive vurderet på baggrund af udregning af radiokemisk renhed. Grænse herfor er bestemt til ≥95%, og det på baggrund af erfaringer fra tidligere forsøg samt overvejelser og rådførelse med bl.a. Rigshospitalet (1) og Novo Nordisk (2,3).

Til forsøget vedrørende inkubationsforhold vil resultaterne yderligere blive statistisk behandlet med en Two-Way ANOVA-test.

**TABEL 2** MOLARITETSFORSØG

Forholdene, hvor vi tilsatte 44, 87 og 131 µg, blev udført 2 gange, da det var i dette interval, vi fandt højest radiokemisk renhed med mindst mulig mængde af NovoSeven.

## RESULTATER

### OPBEVARINGSFORSØG

Data i tabel 3 belyser, hvorvidt den radiokemiske renhed påvirkes, når komplekset DTPA-NovoSeven opbevares i fryser ved -20 °C. Data er indsamlet fra dag 6 til og med 21, og har alle fulgt standardproceduren og er således inkuberet i 60 min. ved stuetemperatur.

### INKUBATION

Inkubationsforsøget blev udført i alt fem gange. De i alt 30 resultater blev behandlet statistisk med Two-Way ANOVA-test. P-værdierne ses i tabel 4.

### MOLARITETFORSØG

I alt blev 11 forsøg udført. Resultaterne af dette forsøg fremgår i tabel 5.

### PULL DOWN

Resultaterne af dette forsøg fremgår af tabel 6.

### DISKUSSION

At mærke <sup>111</sup>In-dTPA-NovoSeven er meget nyt og har derfor på mange områder givet os store udfordringer, ting der

skulle overvejes, vurderes og tages stilling til. Det har betydet, at vi ofte måtte revurdere vores forsøg og lave ændringer, som endvidere har medført den begrænsede datamængde. Resultaterne fra dette projektforsøg må derfor anses som værende vejledende og kan indikere, hvorvidt det enkelte problem er noget, man skal undersøge nærmere med flere gentagne forsøg.

### OPBEVARING

Gennem forsøgsperiodens tre uger blev komplekset DTPA-NovoSeven opbevaret i fryser ved -20 °C. Ved standard inkubationstid og temperatur (60 min., stuetemperatur) var det muligt at opnå radiokemisk renhed  $\geq 95\%$  ved 19 målinger ud af i alt 21.

Resultatet 'Op-22' i tabel 3 ligger relativt langt under de andre. Ved dette forsøg registrerede vi et usædvanligt fald i den radiokemiske renhed fra 94,5% efter 15 min. inkubation til 88,9% efter 60 min. At den radiokemiske renhed falder i takt med tiden, betragtes som usandsynligt, da vi forventer, at den radiokemiske renhed til en vis grænse øges med tiden. Derved betragtes dette resultat som upålideligt.

De øvrige resultater indikerer, at det er muligt at opbevare komplekset i fryser ved -20 °C. Lubde Hooge et al.(4) har lavet et studie, hvori stabiliteten af DTPA-Antistof efter opbevaringen ved -20 °C ligeledes testes. Deres observationer forløber over 15 måneder og en efterfølgende <sup>111</sup>In-mærkning resulterede i en radiokemisk renhed på  $97,2 \pm 1,3\%$ .

Nedfrysning over en kortere periode vil tilsyneladende ikke have en negativ effekt på kompleksets evne til at binde <sup>111</sup>In.

### INKUBATION

Ingen af P-værdierne i den statistiske analyse, iht. tabel 4, som er et uddrag af statistik resultatet, er mindre end 0,05. Dette fastslår, at ingen af disse faktorer (temperatur og tid) influerer på resultatet. Der er dermed ingen signifikant forskel imellem de enkelte grupper. Vi må dog tage forbehold for den meget begrænsede datamængde bestående af 6 forsøg med hver 5 resultater (=30 resultater).

Det skal fremhæves, at der i andre studier af bl.a. Jia et al.(5) er fundet påvirket mærkningseffektivitet med en radiokemisk renhed på  $\geq 95\%$  ved inkubation i 20 min. ved stuetemperatur, og inkubation ved 30 min. (Sakahara et al.(6)) og ved blot 5 min. (Lubde Hooge et al.(4)).

Vores resultater sammenholdt med ovenstående støtter særdeles, at vi i protokollen kan reducere inkubationstiden til 15 min. Stuetemperatur vil dertil være den lettest tilgængelige løsning.

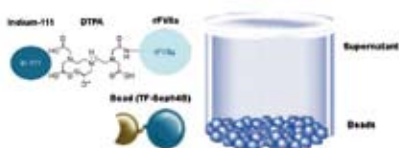
### MOLARITET

I vores forsøgsopstilling bestræbte vi os på at afprøve nogle forudbestemte mængder af DTPA-NovoSeven. Intervallet skulle dække over forholdet i protokollen, som lyder 226 µg pr. 37 MBq. Derfra ville vi reducere mængden af NovoSeven, så vidt grænsen for den radiokemiske renhed tillod det.

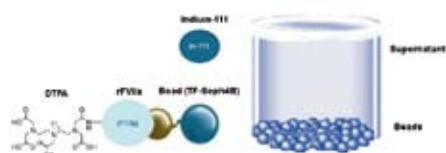
Som det fremgår af 'Mol-11' i tabel 5, kan man i henhold til den radiokemiske renhed godt forsvare at tilsætte ned til 5 gange mindre DTPA-NovoSeven, end der er foreslået i proto-



**FIGUR 1** Er strukturen i proteinet bevaret, og det stadig er funktionelt, må det forventes, at hele komplekset er bundet til beads'ene, som følge af en rFVIIa/tissue factor binding.



**FIGUR 2** Hvis ikke proteinet virker og derved ikke kan binde til TF, vil vi have <sup>111</sup>In-DTPA-rFVIIa i vores supernatant og dermed ingen radioaktivitet på beads'ene.



**FIGUR 3** Hvis proteinet omvendt virker og kan binde til TF, men at <sup>111</sup>In er blevet adskilt fra det resterende kompleks, vil vi have frit <sup>111</sup>In i vores supernatant og stadig ingen radioaktivitet på beads'ene.

kollen. Det vil kunne bidrage til en økonomisk reducere af omkostningerne ved fremstilling af lægemiddelet.

Ved disse forsøg skal det huskes, at det kun er afprøvet 1 gang. Derfor er usikkerheden meget stor og skal undersøges nærmere.

Ved at udregne molforholdene på nogle af de udførte forsøg og ved at anskue den radiokemiske renhed for disse viste det, at der på trods af et stort overskud af <sup>111</sup>Indiummolekyler i forhold til DTPA-NovoSeven stadig kunne opnås en overraskende stor radiokemisk renhed (86,7%).

Da vi antager, at der er bundet ét DTPA-kompleks pr. protein-molekyle(7), kan vi dermed gisne om, at der kan bindes <sup>111</sup>Indium direkte til NovoSeven.

Grunden til dette er, at vi fra teorien om chelatkomplekser ved, at der bindes ét <sup>111</sup>Indium-molekyle til ét DTPA kompleks. Og da vi i vores forsøg har tilsat op mod 5 gange så mange mol indium som mol NovoSeven og stadig opnåede en radiokemisk renhed på 86,7%, tyder det på, at der kan bindes <sup>111</sup>Indium direkte til NovoSeven, eller at der er bundet mere end et DTPA-kompleks pr. NovoSeven.

Det vides nu, at der kan tilsættes mindre mængder DTPA-NovoSeven, end der er angivet i protokollen, og at der med dette stadig kan opnås den samme mærkningseffektivitet. Præcis hvor lidt DTPA-NovoSeven er svært at afgøre. Bl.a. formodes det, at der skal tages hensyn til halveringstider og henfald, når forsøget udføres.

### RATIO MELLE DTPA OG RFVIIA

Som tidligere nævnt er det uvist, hvor mange DTPA-molekyler der er bundet til hvert NovoSeven. Paik et al.(9) finder ved mærkning af antistof, at mere DTPA pr. antistof kan binde mere <sup>111</sup>Indium, hvilket må siges at være aktuelt, når man ønsker høj radiokemisk renhed. Samtidig viser samme studie dog, at antistoffets biologiske aktivitet svækkes, når antallet af DTPA pr. antistof øges. (Se også 'Pull down'). Ligeledes ses der en proportionel sammenhæng mellem et øget antal DTPA pr. antistof og et højere optag i leveren ved in vivo forsøg (Sakahara et. al.(6)).

Da vi ikke ved noget om antallet af DTPA-komplekser pr. NovoSeven, undersøgte vi en <sup>111</sup>Indium-mærkning af NovoSeven uden DTPA. Dette blev afprøvet ved hjælp af pull-down analysen.

Vi ved, at NovoSeven kræver Ca<sup>++</sup> ioner til stede for at være biologisk aktivt. I alt har proteinet 9 metalcentre, hvor til der kan bindes Ca<sup>++</sup> ioner. Dertil ved vi, at både Ca<sup>++</sup> og <sup>111</sup>Indium er metalioner. Teoretisk set burde <sup>111</sup>Indium altså kunne binde direkte til NovoSeven, måske endda med op imod 9 gange. Men om proteinet så efterfølgende er biologisk aktivt, er uvist. Dette blev afklaret ved hjælp af pull-down analysen.

### PULL DOWN

Resultaterne fra pull-down analysen viser overraskende, at <sup>111</sup>Indium kan binde direkte til NovoSeven. Resultaterne indikerer samtidig, at proteinaktiviteten er højest i fravær af DTPA. Lignende forsøg fandt gradvis dårligere bindingsevne ved gradvis højere koncentration af DTPA pr. protein(6,9). >

**TABEL 3** Resultater som indgår i vurderingen af, komplekset DTPA-NovoSevens, stabilitet efter opbevaring ved -20°C

Forsøg	Opbevaring af komplekset ved -20 °C (dage)	Radiokemisk renhed
Op-01	6	96,6%
Op-02	7	97,6%
Op-03	7	94,6%
Op-04	9	97,9%
Op-05	13	96,4%
Op-06	13	97,6%
Op-07	14	97,0%
Op-08	14	97,5%
Op-09	14	97,4%
Op-10	14	96,8%
Op-11	15	98,2%
Op-12	15	98,2%
Op-13	15	97,7%
Op-14	15	97,3%
Op-15	15	96,6%
Op-16	15	95,7%
Op-17	15	97,0%
Op-18	15	96,2%
Op-19	19	96,4%
Op-20	19	97,3%
Op-21	20	98,6%
Op-22	20	88,9%
Op-23	21	98,1%
Op-24	21	96,9%

**TABEL 4** Resultatet af en Two-Way-ANOVA udført i StatGrafichs

Kilde	P-værdi
Temperatur	0,1748
Minutter	0,9476

**TABEL 5** Tabel hvoraf det i 2. kolonne fremgår, hvor meget NovoSeven der er anvendt. Til sammenligning anvendes der i protokollen 226 µg.

Forsøg	µg NovoSeven pr. 37 MBq <sup>111</sup> Indium	Radiokemisk renhed
Mol-01	261	96,8%
Mol-02	218	97,6%
Mol-03	174	97,7%
Mol-04	131	98,3%
Mol-09	131	97,4%
Mol-05	87	94,9%
Mol-10	87	96,8%
Mol-11	44	95,7%
Mol-06	44	94,5%
Mol-07	8,9	93,2%
Mol-08	1,8	86,7%

**TABEL 6** Den procent, der er angivet i 'bundet til beads', er et udtryk for, hvor stor en del af vores NovoSeven der har bundet til tissue factor og derved er biologisk aktivt. Herefter blev den radiokemiske renhed i supernatanten bestemt for at afklare, hvor stor en procentvis del af den resterende <sup>111</sup>indium-mængde, der fortsat var bundet til vores protein.

Resultat af pull-down analyse		
Forsøg	Bundet til beads	Radiokemisk renhed i supernatant
87 µg pr. 37 MBq + DTPA	40%	89%
44 µg pr. 37 MBq + DTPA	42%	78%
Forsøg	Bundet til beads	Radiokemisk renhed i supernatant
87 µg pr. 37 MBq - DTPA	49%	70%
44 µg pr. 37 MBq - DTPA	57%	75%

## FAGLIG

DTPA synes således at påvirke bindingsevnen, der er et udtryk for den biologiske aktivitet, negativt in vitro.

Den radiokemiske renhed blev efterfølgende målt i den tilbageværende opløsning, det vil sige bestemmelse i henhold til figur 1, 2 og 3. Denne blev bestemt til mellem 70-89%.

Det vil sige, at 70-89% af de radioaktive isotoper, der måles i denne opløsning (supernatanten), stammer fra isotoper, der fortsat er bundet til NovoSeven. Dette indikerer, at proteinet formodentlig ikke længere er biologisk aktivt og derfor ikke har bundet til TF.

### KONKLUSION

Af projektets forsøg fremgår det, at den radiokemiske renhed ikke påvirkes, selvom komplekset DTPA-NovoSeven nedfryses og opbevares i en periode over 21 dage.

Inkubationsforsøget giver ligeledes en antydning af, at inkubationstid og temperatur kan ændres, da der ikke er nogen signifikant forskel på tider og temperaturer. Resultaterne indikerer, at inkubationen kan ændres til 15 min. ved stuetemperatur.

Et andet aspekt, vi ønskede at undersøge, var, hvorledes det var muligt at tilsætte mindre mængder DTPA-NovoSeven til den samme mængde <sup>111</sup>Indium, i forhold til det, der er foreslået i forsøgsprotokollen. Her tyder det på, at der kan tilsættes ca. 5 gange mindre DTPA-NovoSeven.

Samlet set kan det konkluderes, at protokollen kan optimeres i form af en hurtigere procedure. DTPA-NovoSevenkomplekset kan opbevares i fryseren, og inkubationen kan reduceres fra de forhenværende 60 min. til 15 min. Proceduren vil fortsat foregå ved stuetemperatur. Dertil kan mængden af DTPA-NovoSeven, der anvendes, reduceres med ca. en femtedel fra 226 µg til ca. 45,2 µg. Ingen af disse ændringer vil influere på den radiokemiske renhed, som stadig under disse omstændigheder kan opnås på ≥95%. □

### Kilder

- 1 Birger Hesse, overlæge, Rigshospitalet
- 2 Novo Nordisk A/S, Haemostasis Biology, Måløv, Carsten I.C. Christoffersen
- 3 Novo Nordisk A/S, Isotope Group, Måløv, Jesper B. Christensen
- 4 Lubde Hooge, et al. "Preclinical characterisation of <sup>111</sup>In-DTPA-trastuzumab". British Journal of Pharmacology 143, 99-106. (2004)
- 5 Jia, et al. "Linker effects on biological properties of <sup>111</sup>In-labeled DTPA conjugates of a cyclic RGDfK dimmer". Bioconjugate chem., 19, 201-210. (2008)
- 6 Sakahara, et al. "Effect of DTPA conjugation on the antigen binding activity and biodistribution of monoclonal antibodies against fetoprotein". Journal of Nuclear Medicine 26, 750-755. (1985)
- 7 Amarnadh Nalla, Ph.D. student, Panum Institutet
- 8 Hnatowich, et al. "The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radionuclides: an improved method". Journal of immunological methods, 65, 147-157 (1983)
- 9 Paik et al. "Factors Influencing DTPA Conjugation with Antibodies by Cyclic DTPA An-hydrate 1983.

## DANDIAG

BIOHIT

Innovating for Health

### eLINE Lite Dispenser



En enkel og mere let betjent udgave af eLINE Dispenseren. Kun få program muligheder!

Startpakke  
eLINE Lite Dispenser

**4.500 kr.** eks.moms

Samlet introduktions pris  
Indeholder:  
Biohit eLINE Lite Dispenser,  
Charging Stand og  
Dispenser Tips Starter Kit

### BIOHIT Dispenser Tip



Dispenser Tip kampagne:  
Ved køb af 4 æsker af samme katalog nr. gives 15% rabat

Tilbuddet gælder alle volumen størrelser i standard og præsterile spidser

Kampagnerne gælder i perioden:  
11. Maj - 31. Juni 2009.  
(Kan ikke kombineres med anden rabat)

Dandiag A/S | Mårkærvej 9  
2630 Tåstrup | T: 4343 3057  
www.dandiag.dk  
dandiag@dandiag.dk