

[¹⁷⁷Lu]-Nimotuzumab, radioimunokonjugát s afinitou k EGF receptorům



M. Kropáček, M. Tomeš, K. Kontrová, J. Zimová, Mirzajevová, F. Melichar

Obsah přednášky

- **Úvod**

- Základní informace o protilátce Nimotuzumab

- **Popis výroby [¹⁷⁷Lu]-Nimotuzumab**

- **Testování**

- Stabilita konjugátu
- 1. část preklinické studie – distribuce a eliminace na zdravých zvířatech

- **Shrnutí a závěr**

- ∞ Experimentální činnost v rámci **grantové podpory TAČR**
 - Příjemce: RadioMedic s.r.o.
- ∞ Řešené okruhy v rámci projektu
 - **Vývoj ^{177}Lu -Nimotuzumab (hR-3)**
 - Vývoj metod přípravy derivátů bombesinů ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{177}Lu , ^{67}Cu
 - Vývoj přípravků značených F-18
 - Deriváty [^{18}F]flumazenilu diagnostika ložisek epilepsie
 - 16- α -[^{18}F]fluoroestradiol diagnostika karcinomu prsu
- ∞ Spolupráce
 - **PřFUK Univerzita Karlova v Praze**
 - Vývoj nových bifunkčních ligandů vhodných pro konjugaci
 - **ÚJV Řež, a.s.**
 - Laboratoř biologického testování - **preklinické testování na zvířatech**

Úvod – Nimotuzumab, hR3, EGFR

∞ Nimotuzumab (hR-3)

- Humanizovaná *monoklonální protilátka* typu IgG1 s afinitou k receptorům EGF

∞ EGF – epidermální růstový faktor

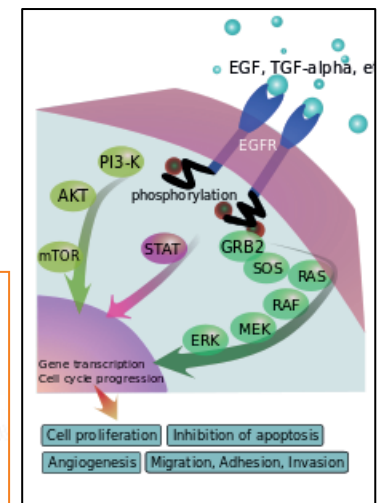
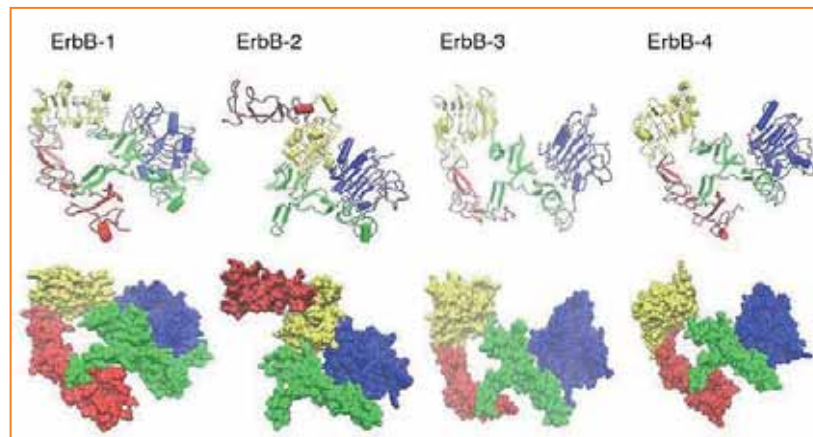
∞ EGFR patří do skupiny receptorů ErbB (tyrosin-kináz)

- ErbB-1 epidermal growth factor receptor (EGFR)

- ErbB-2 (HER 2)

- ErbB-3 (HER 3)

- ErbB-4 (HER 4)



Úvod – Nimotuzumab, hR3, EGFR

∞ Vyvinuto: Center of Molecular Immunology (CMI), Havana, Kuba

∞ Komericializace:

- Kanada CIMYM Biosciences, **TheraCIM**
- Evropa Oncoscience, **Theraloc, CIMAher**

∞ Schválen k léčbě

- Dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku (Indie, Kuba, Argentina ...)
- Gliomu (Ukrajina)
- Slinivky břišní (Evropa, pokud je prokázán dlaždicobuněčný původ nádoru)

Výroba [^{177}Lu]Nimotuzumabu

- Přípravné práce
 - Sterilizace roztoků a materiálů
 - Zakoncentrování Nimotuzumabu
- Konjugace
- Purifikace
- Kontrola kvality konjugátu před značením
- Značení konjugátu s ^{177}Lu
- Kontrola kvality konjugátu označeného ^{177}Lu

Výroba - přípravné práce I.

☞ Sterilizace roztoků filtrací přes 0,22 μm filtr

- Voda (trace select)
- PBS pufr - konjugace
- Acetátový pufr - značení s ^{177}Lu

☞ Sterilizace materiálů

- Sterilizace 80% roztokem ethanolu
 - Vivaspin 6
- Sterilizace v autoklávu
 - Eppendorf, skleněné lahvičky, špičky ...

Výroba - přípravné práce II.

☞ Zakoncentrování protilátky

- 5 mg/ml v PBS 10-20 mg/ml



☞ Vivaspin 6

- Cut-off 30.000 Da
- Centrifugace při 4000 ot/min 30 min

- ☞ **Všechny operace probíhají v laboratoři třídy čistoty „C“, kritické operace v laminárním boxu „A“**

Vivaspin 20 Diafiltration



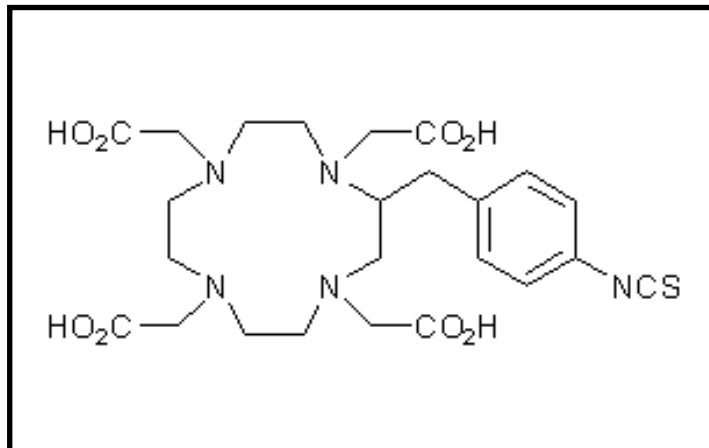
Diafiltration cup is filled with buffer solution (Product No: VSA005)

During concentration, solvent in sample is continuously replaced by fresh buffer solution.

Salts and contaminants are progressively cleared through membrane and into filtrate vessel

Výroba - konjugace

- **Konjugace protilátky Nimotuzumab (hR3) s bifunkčním ligandem DOTA**



p-SCN-Bz-DOTA

inkorporace kovového
radionuklidu

- roztoky ligandu v DMSO,
koncentrace 50-70 mg/ml

Podmínky konjugace

- Molární poměr hR3:Ligand je 1:10
- Prostředí 0,1 M PBS
- Inkubace 2 h, LT
- Mírné třepání (450 rpm)
- Rozmezí pH 8,2-8,6
- **Po 1 h reakce kontrola pH**
⇒ kritický parametr !!
- Stop reakce – 1,5 M TRIS/HCl, pH 8,88

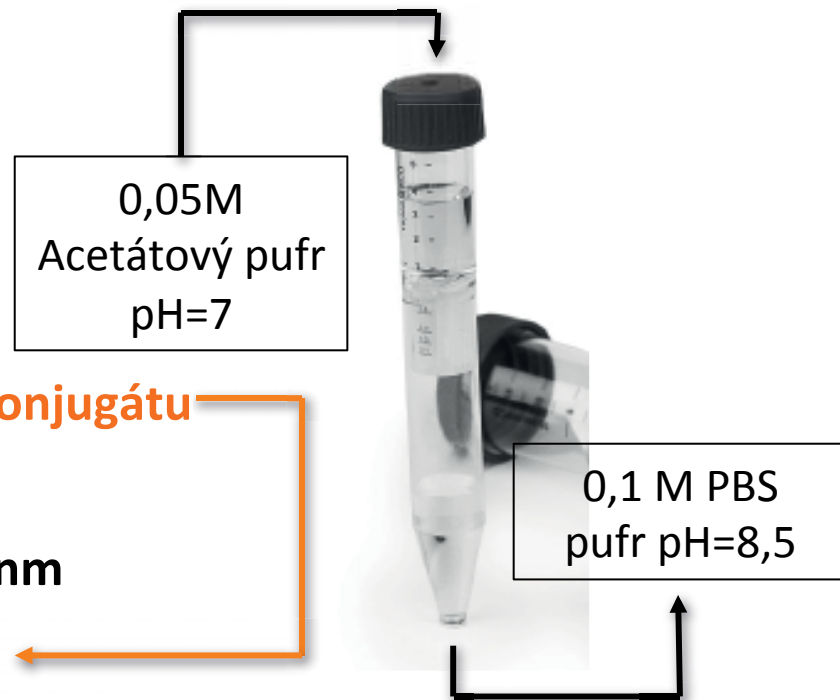
Výroba - Purifikace

➤ Purifikace pomocí Vivaspin 6

- Centrifugace
- Odběr filtrátu pro měření UV/VIS
- Doplnění na 6 ml
- Vortex 5 min pro omezení **sorpce konjugátu**

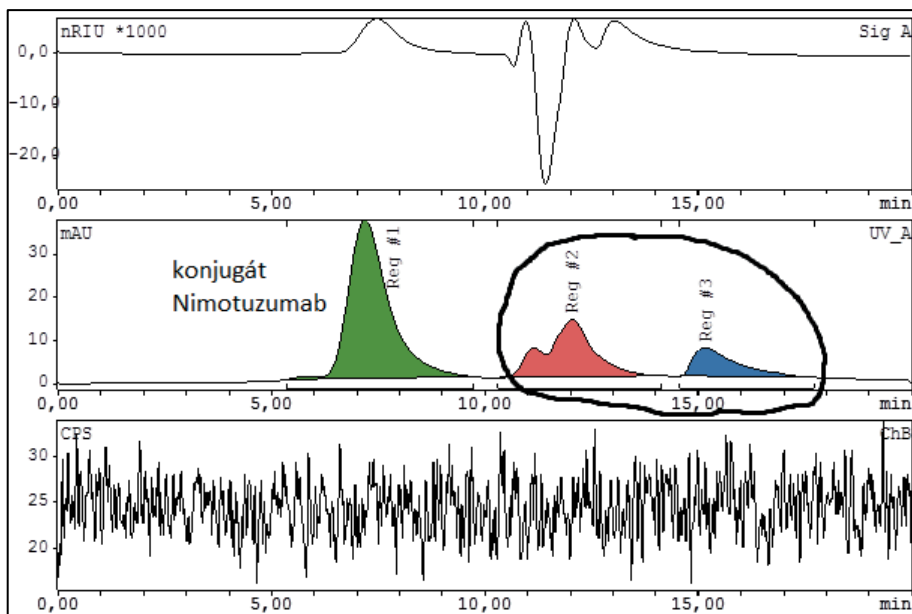
❖ **Spektrofotometrie filtrátu při 280 nm**

❖ **Analýza na HPLC s UV/VIS detekcí**

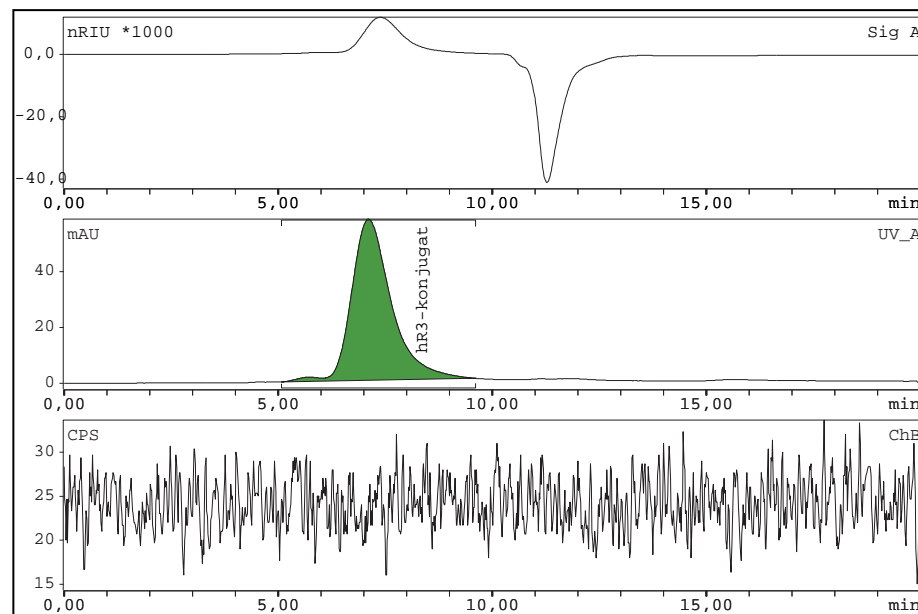


Odstranění zbytků nezreagovaného ligandu, převedení z 0,1 M PBS do 0,05 M NH_4OAc

Kontrola průběhu purifikace



Konjugát Nimotuzumab
před purifikací



Konjugát Nimotuzumab
po purifikaci
Vivaspin 6

Kontrola procesu purifikace pomocí HPLC s UV detekcí při 280 nm

Kontrola kvality konjugátu HPLC

Metoda HPLC

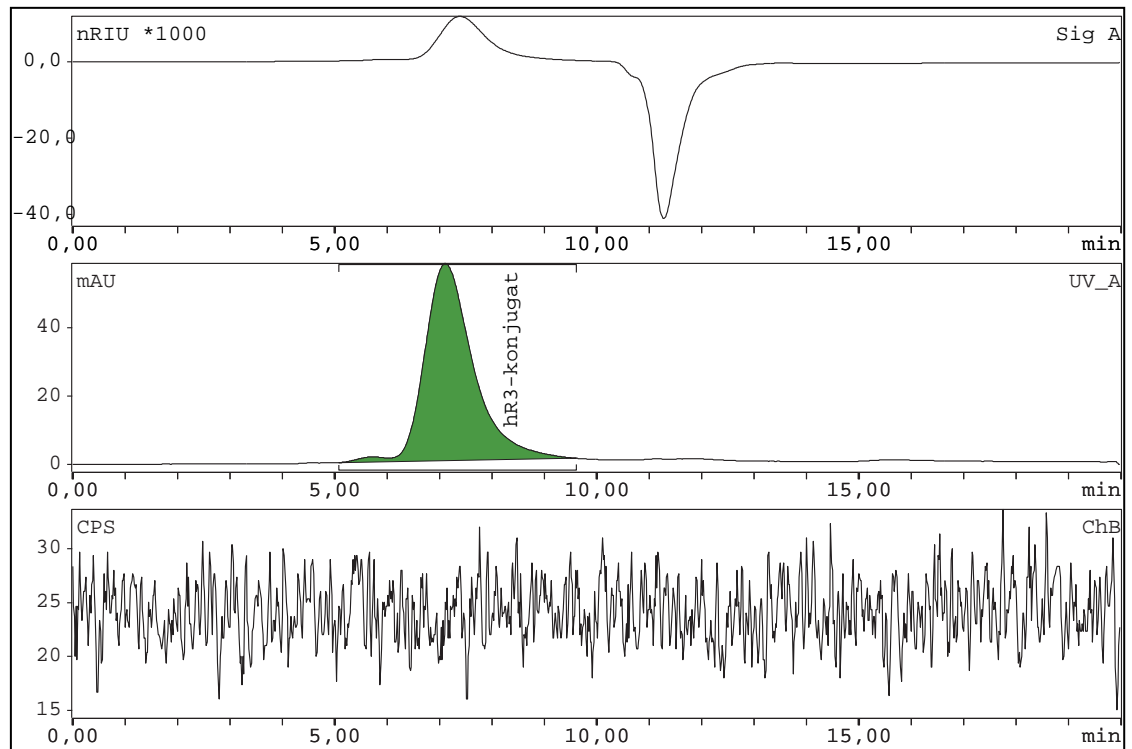
∞ Separace

- Kolona: **TSK-GEL SW 3000**
(7,5x300 nm, 10 μ m)
- **Mobilní fáze 0,1M PBS + EDTA**
- Průtok 1 ml/min

∞ Nástrík 20 μ l

∞ Detekce

- **UV detektor 280 nm**



Značení konjugátu s Lu-177



Radionuklid

- ^{177}Lu v 0.05 M HCl
- I.T.G. Garching, Německo
- Forma – bez nosiče (n.c.a.)

Podmínky značení

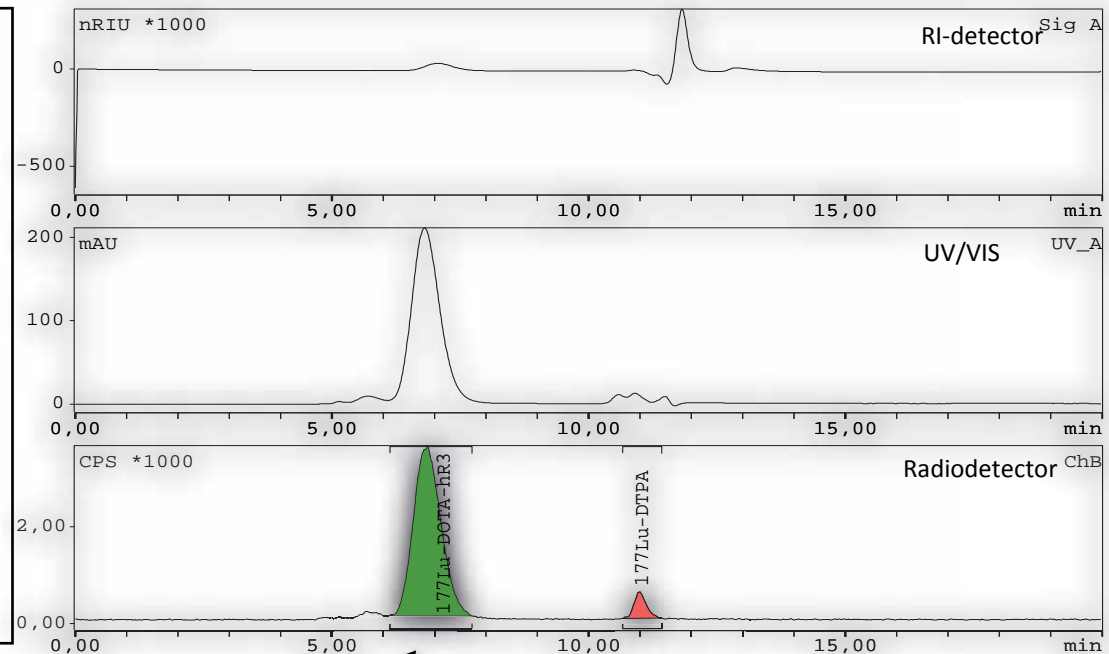
- Specifická aktivita 100 MBq/mg konjugátu
- Prostředí 0.5 M octan amonný pH 6,5 – 7,0
- Reakční objem 1 ml
- **Inkubace při 42°C po dobu 1 hodinu**
 - Před měřením přidavek 0,01 M DTPA (pH 6.0) a inkubace 15 min LT

Kontrola kvality ^{177}Lu -Nimotuzumab

Radiochemická čistota (HPLC)

Separace

- Kolona: **TSK-GEL SW 3000**
(7,5x300 nm, 10 μm)
- **Mobilní fáze 0,1M PBS + EDTA**
- Průtok 1 ml/min
- **Nástřik 20 μl**
- **Detekce**
 - **Radiodetektor - NaI(Tl)**



^{177}Lu -hR3
konjugát

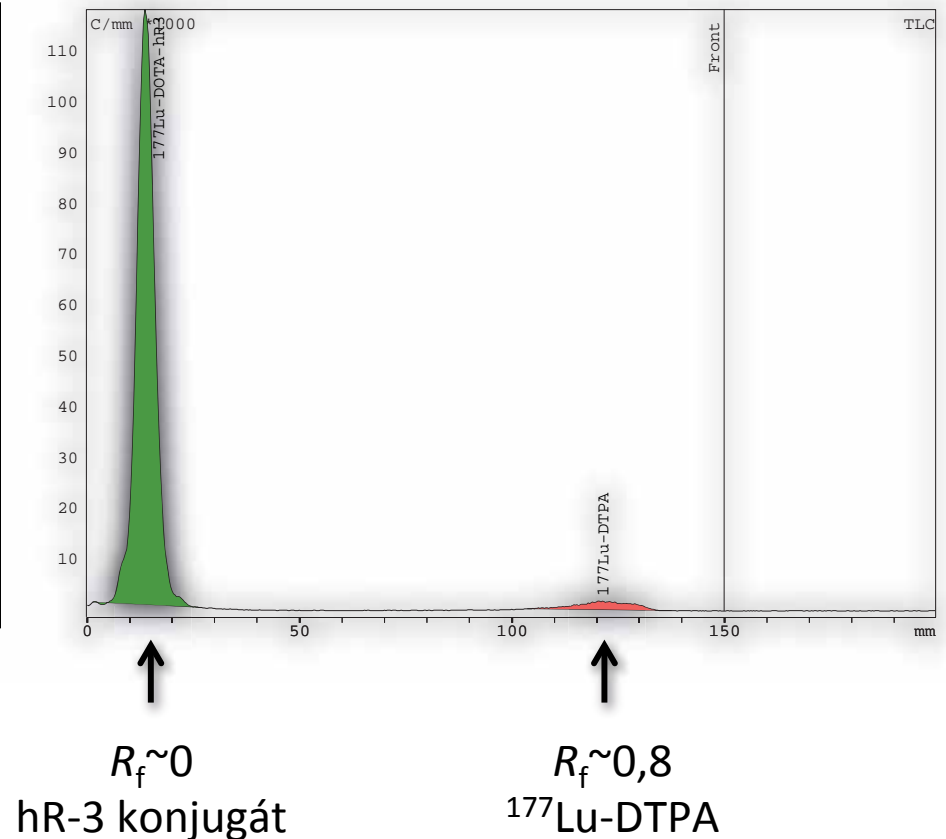
^{177}Lu -DTPA

Kontrola kvality ^{177}Lu -Nimotuzumab

Radiochemická čistota (ITLC-SG)

Separace:

- ITLC-SG
- Octan amonný 10% (w/v) a methanol (1:1)
- Před separací inkubace s DTPA
 - vazba volného ^{177}Lu



Testování – stabilita konjugátu

☞ Sledovaná doba: 9 dní (*neznačený konjugát*)

☞ **Testování značením s Lu-177**

- Specifická aktivita 100 MBq Lu-177 na 1 mg konjugátu
- Značení ve dvou pufrech
 - Pufř 0,5 M octan amonný
 - Pufř PBS
- Podmínky skladování: 4-8°C

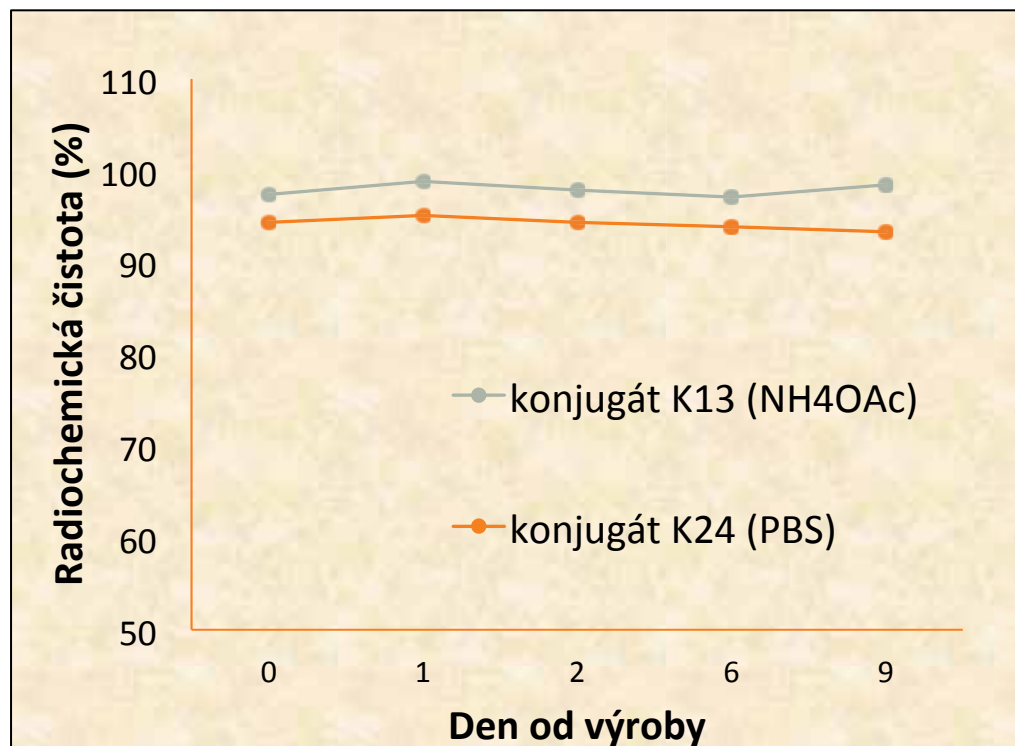
☞ **Stanovení radiochemické čistoty**



odhad stability

Testování – stabilita konjugátu

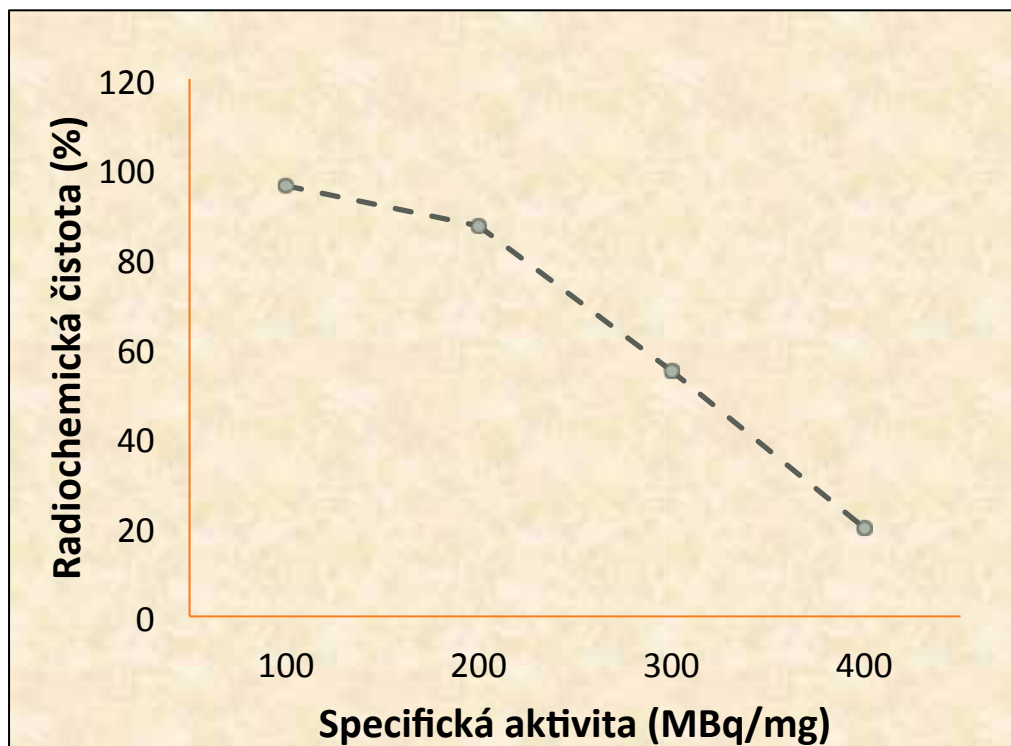
Radiochemická čistota – značení v acetátovém pufru a v PBS



Den	Radiochemická čistota (%)	
	NH ₄ OAc	PBS
0	97,4	94,4
1	98,9	95,1
2	97,9	94,4
6	97,1	93,9
9	98,5	93,4

Testování – stabilita konjugátu

Radiochemická čistota – vliv objemu použitého roztoku Lu-177



MBq/mg IgG	Radiochemická čistota (%)
100	96,2
200	87,1
300	54,8
400	19,7

Preklinické studie - přehled

STUDIE



ELIMINACE

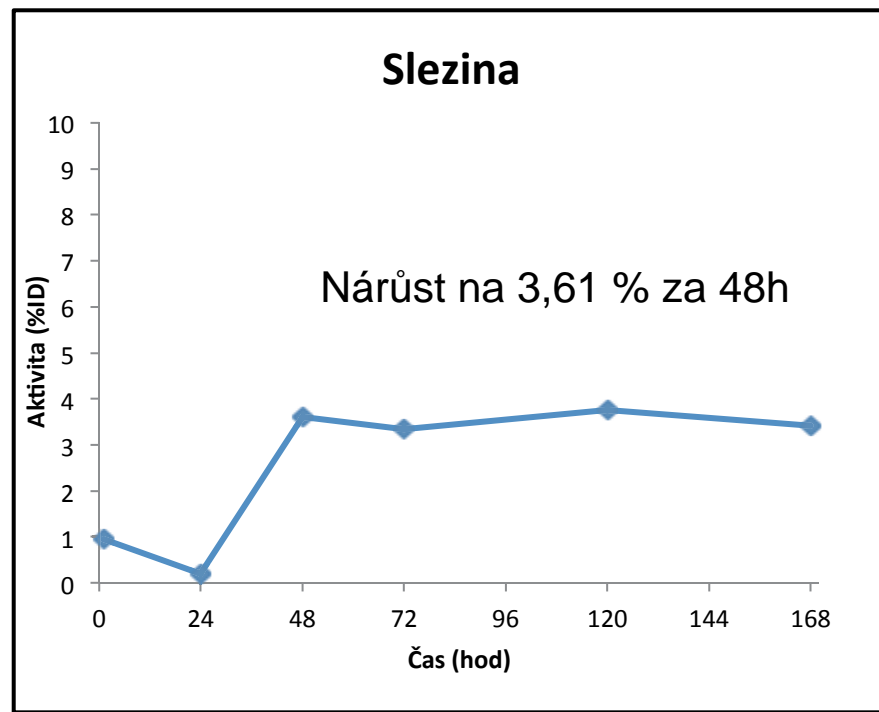
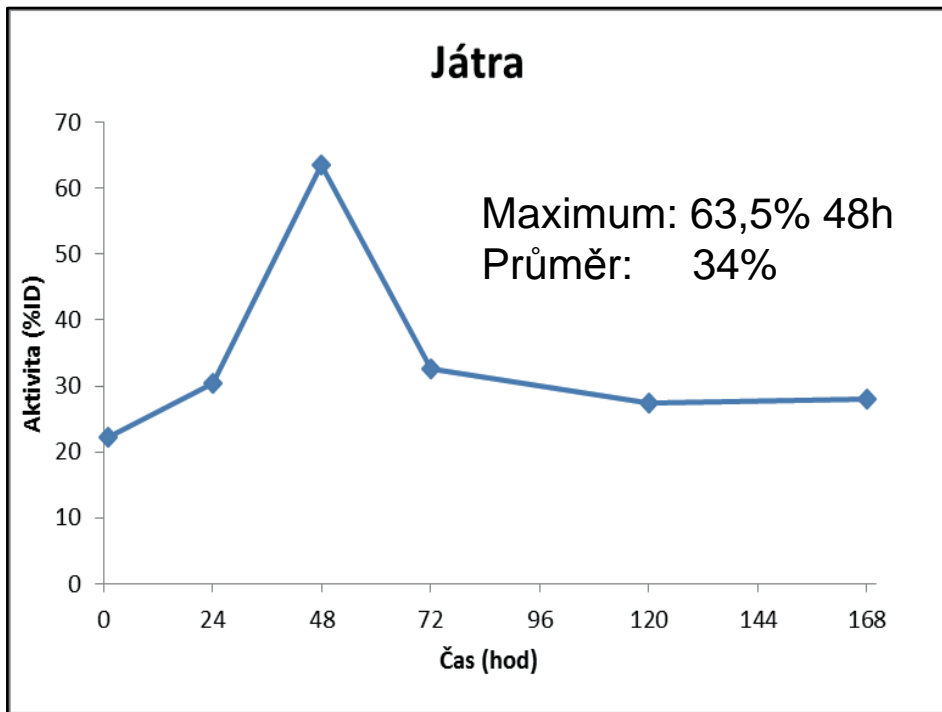
- Krevní clearance - odběry 10 min, 30 min, 1, 6, 24, 48, 72 a 168 hod
- Renální exkrece – odběry 4, 8, 16, 20 a 24 hod

DISTRIBUCE

- Distribuce aktivity v jednotlivých orgánech – odběry 1, 24, 48, 72, 120 a 168 hod

- Zdraví potkaní samci Wistar, 190-260 g
- Počet jedinců: 56
- Požadavek: 3,7 MBq v 0,2 ml / aplikaci - intravenózně
 - 400 MBq ve 20 ml
- Testy provedeny:
 - ÚJV Řež, a.s. Laboratoř biologického testování

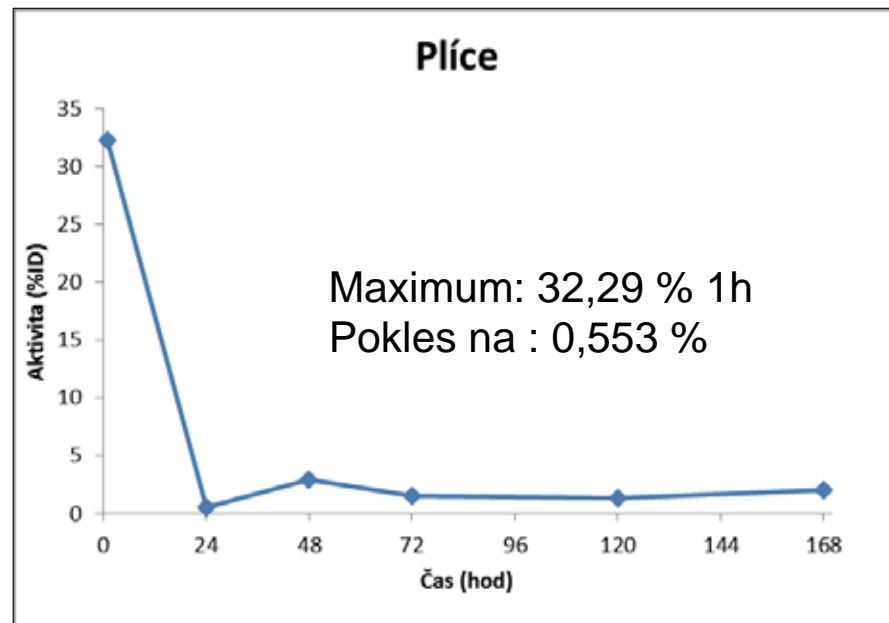
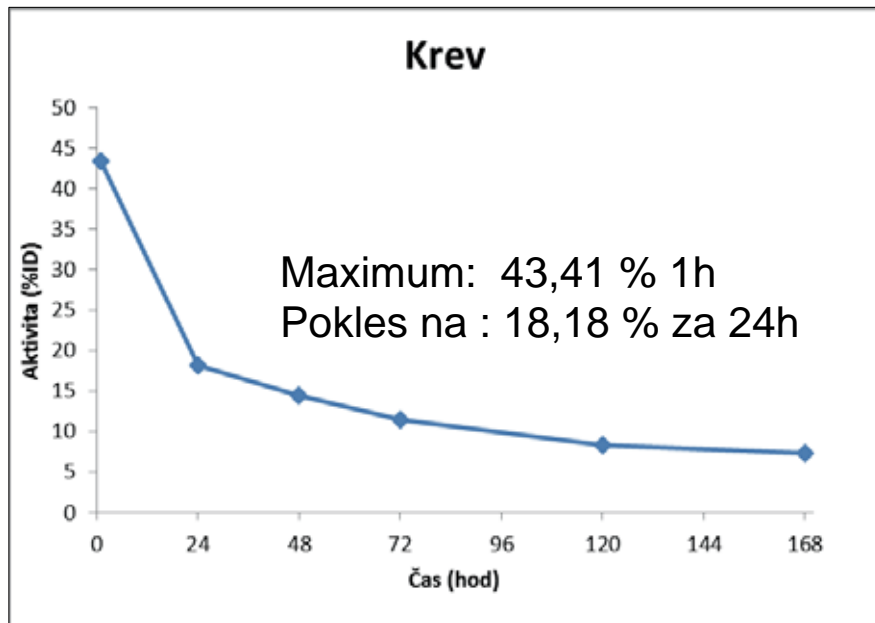
Preklinické studie – fyziologická distribuce



Závislost aktivity v játrech na čase
(vztaženo na celý orgán)

Závislost aktivity ve slezině na
čase (vztaženo na celý orgán)

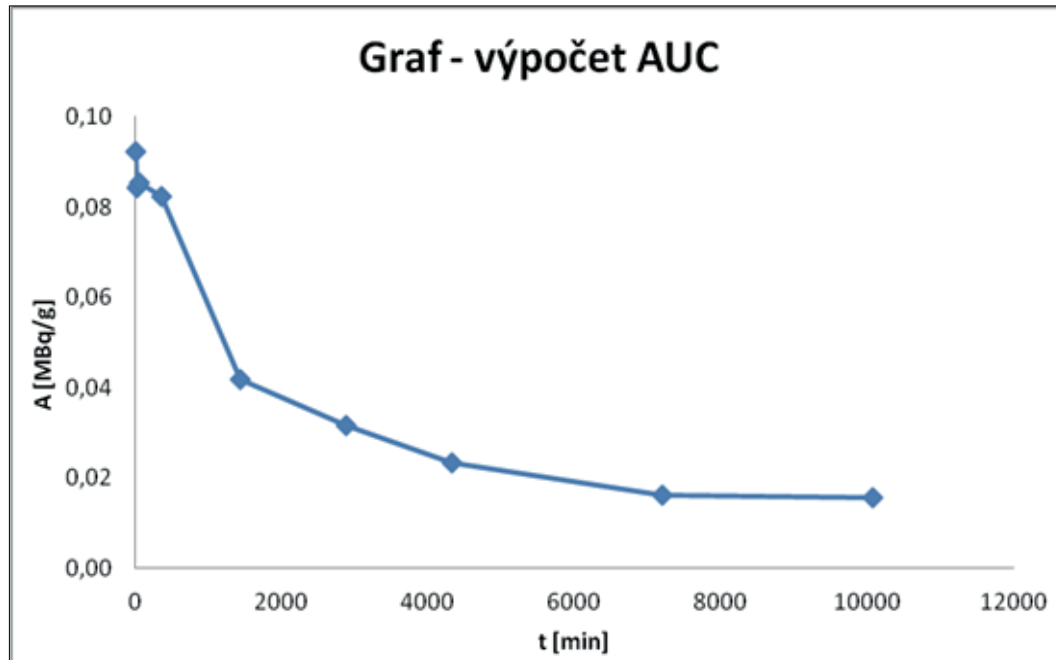
Preklinické studie – fyziologická distribuce



Závislost aktivity v krvi na čase
(vztaženo na celkovou hmotnost krve)

Závislost aktivity v plicích na čase
(vztaženo na celý orgán)

Preklinické studie – krevní clearance



- Získané hodnoty numericky integrovány + výpočet plochy pod křivkou – **AUC**
- **Stanovena krevní clearance**
 - **0,01146 ml/min**
 - **0,6876 ml/hod**

Preklinická studie – stručné shrnutí I.

DISTRIBUCE

- Nejvyšší aktivita nalezena v **játrech** (průměr 34%), maximum 63,5% aktivity bylo 48 od aplikace
- **Slezina:** během 48 h od aplikace vzrůst na 3,61 %, poté už jen nepatrné změny
 - **biologická degradace protilátky v těchto orgánech**
- **Plíce:** nejvíce 1 h od aplikace – 32,29 %, za 24 h pokles až na 0,553 %
 - **v souladu s předpokladem intenzivního prokrvení plic**
- **Krev:** nejvíce 1 h od aplikace 43,41 %, po 24 h pokles na 18,17 %

Preklinická studie – stručné shrnutí II.

ELIMINACE

➤ RENÁLNÍ EXKRECE

- Nejvíce aktivity uvolněno v prvních 4 h od aplikace (6,028 %)
- Po dalších 20 h vylučováno průměrně 0,807 % skutečně podané aktivity za 4 hodiny ➡ svědčí o **stabilitě vazby Lu-177 na protilátku**

➤ KREVNÍ CLEARANCE

- Stanovena 0,01146 ml/min ➡ 0,6876 ml/hod

IMUNOREAKTIVITA

- Vazba ¹⁷⁷Lu-MAb **potvrzena** metodou **ELISA** před aplikací

ZÁVĚR

- **Nedochází k degradaci vazby ¹⁷⁷Lu-MAb**
- **Potvrzena standardní orgánová distribuce a eliminace**

Závěrečné shrnutí

- ✓ Optimalizace výrobního postupu pro konjugaci a značení
- ✓ Výroba konjugátů a značení respektuje principy SVP
- ✓ Připraveny nové řady konjugátů pro testy stability a preklinické studie
 - Stanovena **stabilita konjugátu** 9 dní od výroby
 - Stanovena **fyziologická distribuce a eliminace**
- **Plán**
 - Biodistribuce na nádorových zvířatech

Děkuji za Vaši pozornost!

Náš tým:

Mgr. Marek Tomeš, Ph.D.
Ing. Kateřina Kontrová, Ph.D.
Ing. Jana Zimová, Ph.D.
Ing. Marcela Mirzajevová

Ing. Martin Kropáček, Ph.D.

Spolupráce:

ÚJV Řež, a.s. Laboratoř biologického testování

Finanční podpora:

TAČR – projekt TA03010878

