



تولید، کنترل کیفی و توزیع زیستی قطعه‌ی $F(ab')_2$ آنتی‌بادی PR81 نشان‌دار شده با ^{99m}Tc ، به منظور تشخیص تومور کارسینومای سینه‌ی موش

مجتبی سلوتی^{۱*}، محمدحسین بابایی^۲، حسین رجیبی^۳، هاله فروتن^۴، محمدجواد رسایی^۵، احمد بیطرفان رجیبی^۵،
فریبا جوهری‌داه‌آ، محمد مزیدی^۲، جواد محمدنژاد^۲، محمد شفیعی^۲

- ۱- گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، کدپستی: ۴۵۱۵۶-۵۸۱۴۵، زنجان - ایران
- ۲- گروه رادیوایزوتوپ، پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۱۴۳۹۵-۸۳۶، تهران - ایران
- ۳- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، تهران - ایران
- ۴- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، تهران - ایران
- ۵- بخش پزشکی هسته‌ای، مرکز پزشکی و پژوهشی بیماری‌های قلبی - عروقی بیمارستان شهید رجایی، کدپستی: ۱۹۹۶۹-۱۱۱۵۱، تهران - ایران

چکیده: قطعات آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌بادی‌های کامل، دارای مزایایی برای جذب و نفوذ در تومورها هستند. هدف از این مطالعه تهیه قطعات $F(ab)_2$ از آنتی‌بادی PR81 و نشان‌دارسازی آن‌ها با ^{99m}Tc ، به منظور تولید یک رادیوداروی زیستی برای تصویربرداری از سرطان سینه در پزشکی هسته‌ای است. بدین منظور آنتی‌بادی PR81 با استفاده از آنزیم پپسین به نسبت ۱ به ۲۰ (آنزیم به آنتی‌بادی) در زمان‌های مختلف هضم گردید تا بهترین زمان هضم کامل آنتی‌بادی به دست آید. قطعات $F(ab)_2$ تولید شده، به وسیله ستون کروماتوگرافی پروتیین A تخلیص شدند. ایمونوراکتیویته‌ی قطعات آنتی‌بادی با استفاده از روش رادیوایمونواسی برابر $65.2 \pm 5.1\%$ تعیین گردید. نشان‌دارسازی قطعات $F(ab)_2$ با ^{99m}Tc با استفاده از HYNIC به عنوان کی‌لیت‌ساز و تراپسین به عنوان کو‌لیگانند، در مدت یک ساعت پس از شروع واکنش، با خلوص رادیوشیمیایی $70.1 \pm 5.2\%$ و با پایداری بالا انجام شد. محصول تولیدی جهت افزایش خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از روش کروماتوگرافی ژلی تخلیص گردید. مطالعات توزیع زیستی و تصویربرداری در موش‌های BALB/c دارای تومور پستان پیوندی، تجمع مولکول تولید شده را ۴ ساعت پس از تزریق با حساسیت بالایی در تومور سینه بدون تجمع محسوسی در سایر اندام‌ها نشان داد. این نتایج بیان‌گر آن است که قطعه‌ی $F(ab)_2$ آنتی‌بادی PR81 یک کاندیدای امیدوارکننده برای مطالعات تصویربرداری از کارسینومای سینه‌ی انسان به روش رادیوایمونوسیتی گرافی است.

واژه‌های کلیدی: کارسینومای سینه، رادیوایمونوسیتی گرافی، آنتی‌بادی PR81، قطعه‌ی $F(ab)_2$ نشان‌دارسازی با تکنسیم- 99m

Production, Quality Control and Biodistribution Study of $F(ab')_2$ Fragment of Antibody PR81 Labeled with ^{99m}Tc for Diagnosis of Breast Carcinoma Bearing Mice

M. Salouti^{1*}, M.H. Babaei², H. Rajabi³, H. Forootan², M.J. Rasaei⁴, A. Bitarafan Rajabi⁵, F. Johari Daha²,
M. Mazidi², J. Mohammad Nejad⁴, M. Shafiee²

- 1- Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Zanjan Branch, Postcode: 45156-58145, Zanjan - Iran
- 2- Radioisotopes Department, Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, P.O. Box: 14395-836, Tehran - Iran
- 3- Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-331, Tehran - Iran
- 4- Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-331, Tehran - Iran
- 5- Department of Nuclear Medicine, Rajaei Cardiovascular, Medical and Research Center, Postcode: 19969-11151, Tehran - Iran

Abstract: Immunoglobulin fragments offer a number of advantages for intratumor penetration over the intact antibodies. The goal of this study was to prepare $F(ab')_2$ fragments from antibody PR81 and ^{99m}Tc labeling in order to produce a biological radiopharmaceutical for imaging of breast cancer in nuclear medicine. The antibody PR81 was digested with 5% (w/w) pepsin at different times to find the best time for a complete digestion. The prepared $F(ab')_2$ fragments were purified by protein A column chromatography. The immunoreactivity of the complex assessed by radioimmunoassay was determined to be $65.2\% \pm 5.1$. ^{99m}Tc radiolabeling of $F(ab')_2$ fragment by using HYNIC as a chelator and tricine as a co-ligand resulted in a radiochemical purity of $70.1\% \pm 5.2$ after 1 hr with a high stability. The complex was purified by the gel chromatography method to increase the radiochemical purity. Biodistribution and imaging studies in BALB/c mice with breast tumor xenograft demonstrated as a specific localization of the compound at the site of tumors 4 h post injection with high sensitivity and minimum accumulation in non target organs. The results showed that $F(ab')_2$ fragment of PR81 is a promising candidate for radioimmunoscintigraphy of the human breast carcinoma.

Keywords: Breast Carcinoma, Radioimmunoscintigraphy, Antibody PR81, $F(ab')_2$ Fragment, ^{99m}Tc Labeling

*email: saloutim@yahoo.com



۱- مقدمه

شایع‌ترین سرطان در ایران در میان زنان، سرطان سینه است که ۲۲ درصد از کل سرطان‌های زنان را شامل می‌شود. عدم تشخیص به موقع این بیماری در ۷۰٪ موارد منجر به مرگ می‌شود [۱]. آنتی‌بادی PR81 یک آنتی‌بادی مونوکلونال موشی بر علیه آنتی‌ژن MUC1 است که توسط گروه زیست فن‌آوری دانشگاه تربیت مدرس بر علیه سرطان سینه‌ی انسان تهیه شده است [۲]. نشان‌داری‌سازی این آنتی‌بادی با ^{99m}Tc به روش‌های مستقیم و غیرمستقیم، قبلاً توسط صلوتی و همکارانش انجام و مشخص شده است که آنتی‌بادی نشان‌دار شده می‌تواند با حساسیت بالایی تومور سینه را در مدل‌های حیوانی هدف‌گیری نماید [۳ تا ۶]. نظر به این که آنتی‌بادی PR81 یک آنتی‌بادی موشی است تزریق آن به انسان می‌تواند منجر به واکنش‌های آلرژیک ⁽¹⁾(HAMA) شود [۷]. هم‌چنین آنتی‌بادی‌های کامل به دلیل بزرگ-اندازه بودن با سرعت کمی از بدن دفع می‌شوند. این مسئله سبب ایجاد فعالیت زمینه‌ای بالا در تصاویر سینتی‌گرافی و در نتیجه عدم تشخیص تومورهای کوچک خواهد شد [۸ تا ۱۲]. هدف از این تحقیق تهیه‌ی قطعات F(ab')_2 از آنتی‌بادی مونوکلونال PR81، نشان‌داری آن‌ها با ^{99m}Tc و بررسی میزان جذب توموری کمپلکس تولید شده در مدل موشی مبتلا به کارسینومای سینه پیش از شروع مطالعات انسانی به منظور تشخیص زودرس سرطان سینه به روش رادیوایمونوسینتی‌گرافی است.

۲- بخش تجربی

۲-۱ مواد

کلرید قلع، استیک اسید، هیدروکلریک اسید، کلرامین T، تریسین، تریپسین، سیلیکاژل و hIgG از شرکت Sigma؛ مواد لازم جهت ساخت محیط کشت شامل: گلوتامین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، سدیم پیروات، سدیم آزاید، دی‌هیدروژن سدیم فسفات، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، FCS و محیط کشت RPMI 1640 از شرکت گیبکو، آنزیم پپسین و سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شرکت مرک، پودر سفادکس G-25، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) و پروتیین A از شرکت فارماسیا، فیلتر ۰/۲ میکرون و مجموعه‌ی فیلتراسیون از شرکت سارتوریوس؛ ^{99m}Tc ، ^{125}I و HYNIC از گروه رادیوایزوتوپ

پژوهشکده علوم هسته‌ای پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، MCF-7 سلول‌های کارسینومای سرطان سینه‌ی انسان از بانک سلولی انستیتو پاستور، و موش هم‌خون BALB/c ماده از آزمایشگاه علوم حیوانی انستیتو پاستور تهیه شدند.

۲-۲ وسایل و دستگاه‌ها

سانتریفیوژ مدل Omnifuge 2 RS/ Heraeus sepatech ساخت آلمان، گاماکانتر نوع EG & G/ ORTEC/ Model 4001 M ساخت آمریکا، میکروسکوپ معمولی Gallenkamp ساخت آلمان، میکروسکوپ فاز معکوس Nikon/Diaphot ساخت ژاپن، ترازو Sartorius Ag Gottingen/PB 110s/ Max 110g, d=0. ساخت آلمان، اسپکتروفتومتر UV/VIS نوع UV/VIS Grating 752 ساخت چین، انکوباتور نوع CO₂/Water-Jacketed Incubator NeuAir، ساخت آمریکا، دستگاه الکتروفورز مینی‌ژل و دستگاه کروماتوگرافی FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)، از شرکت Pharmacia LKB Biotechnology سوئد، سانتریفیوژ یخچال‌دار ساخت شرکت Ependorf آلمان، دوربین گامای دابل هد، Mediso, NuclineTM SPIRIT ساخت آمریکا، pH متر مدل M225 شرکت CORNING ساخت انگلستان دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش بودند.

۲-۳ مدل حیوانی تومور سینه

موش‌های هم‌خون BALB/c ماده با روش پیوند بافت، مبتلا به سرطان سینه شدند. تومور اولیه‌ی بافت پیوندی، از تومور طبیعی سینه در یک موش هم‌خون BALB/c ماده تهیه شده بود. براساس مطالعات پاتولوژیک، تومور این موش از نوع آدنوکارسینومای سینه بوده است [۱۳]. موش‌های هم‌خون ماده‌ی سالم با وزن ۲۰ تا ۳۰ گرم و سن ۸ تا ۱۰ هفته برای پیوند تومور سینه مورد استفاده قرار گرفتند. تومور سینه‌ی اولیه به قطعات ۲×۲×۲ میلی‌متری بریده شده و در پهلوی چپ موش‌ها و در زیر پوست پیوند زده شد. همه‌ی آزمایش‌های حیوانی با رعایت قوانین کمیته‌ی مراقبت‌های حیوانی دانشگاه تربیت مدرس مطابق با راهنمایی‌های انستیتو ملی راهنمای سلامتی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام پذیرفت.



۴-۲ تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال PR81

کرایوتیوب حاوی سلول‌های هیبریدوما تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلونال PR81 از گروه زیست فن‌آوری دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. کرایوتیوب به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از اضافه کردن ۹ میلی‌لیتر محیط کشت کامل (با FCS ۱۰٪) به کرایوتیوب، محتویات آن (به وسیله نیروی گریز از مرکز) سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل (حاوی سلول‌های هیبریدوما) در محیط کشت RPMI کامل با FCS ۲۰٪ قرار گرفت. طی روزهای بعدی محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری و سلول‌ها با محیط کشت جدید تغذیه شدند. این محیط حاوی آنتی‌بادی مونوکلونال PR81 به همراه سایر پروتئین‌ها بود. از طریق فیلتراسیون، جداسازی و نگهداری مولکول‌های بزرگ از مولکول‌های کوچک انجام شد. برای رسوب‌دهی به منظور حذف پروتئین‌های غیرایمونوگلوبولینی موجود در نمونه از آمونیم سولفات استفاده شد. سپس نمونه در بافر فسفات سالین نمکی حل و به روش لوری تعیین غلظت انجام پذیرفت و در اندازه‌های کوچک‌تر در فریزر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا شروع مراحل بعدی تحقیق نگهداری گردید.

۵-۲ هضم آنزیمی آنتی‌بادی PR81 به قطعات $F(ab)_2$

آنتی‌بادی PR81 با استفاده از بافر سدیم استات ۰/۱ مولار در دمای ۴°C به مدت یک شبانه‌روز دیالیز شد. pH محلول با استفاده از استیک اسید ۲ مولار به صورت قطره چکانی و با استفاده از تکاننده روی ۴/۲ تنظیم گردید. آنزیم پپسین با غلظت ۲mg/ml به نسبت وزنی ۱ به ۲۰ (آنزیم به آنتی‌بادی) به آنتی‌بادی اضافه و محلول در دمای ۳۷°C در حمام آب قرار داده شد. در زمان‌های ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲ ساعت از محلول نمونه‌برداری و میزان هضم آنتی‌بادی با آنالیز SDS-PAGE بررسی و زمان مناسب هضم به دست آمد. واکنش هضم با اضافه کردن هیدروکلریک اسید ۲ مولار با pH=۸ به میزان ۰/۰۲۵ برابر حجم محلول آنتی‌بادی در زمان مناسب متوقف گردید. سپس نمونه، سانتریفیوژ شده و رسوب آن جدا گردید. قطعات $F(ab)_2$ آنتی‌بادی PR81 با استفاده از روش افینیتی کروماتوگرافی و به وسیله پروتئین A تخلیص و خلوص آن با آنالیز SDS-PAGE بررسی گردید [۱۴ تا ۱۷].

۶-۲ سنجش ایمونوراکتیویته‌ی قطعات $F(ab)_2$

از سلول‌های MCF7 (۱,۰۷cells/ml)، غلظت‌های متوالی 5×10^6 ، $2,5 \times 10^6$ ، $1,25 \times 10^6$ ، $0,625 \times 10^6$ ، $0,31 \times 10^6$ در لوله‌های آزمایش تهیه و حجم آن‌ها با PBS (دارای ۱٪ BSA) به ۱ میلی‌لیتر رسانده شد (به صورت ۳ تایی). قطعات $F(ab)_2$ با ^{125}I به روش کلرامین تی نشان‌دار گردید [۱۸]. به هر یک از لوله‌ها، ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌بادی نشان‌دار شده با غلظت ۴۰ng/ml (حدود ۱۰۰۰۰cpm) اضافه شد. لوله‌ها به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سلول‌ها با تندی ۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. فعالیت رسوب سلولی و محلول رویی هر لوله با استفاده از شمارگر گاما شمارش شد. با استفاده از منحنی Lineweaver-Burk (منحنی فعالیت کل به فعالیت متصل شده به سلول‌ها برحسب عکس غلظت سلول‌ها) و براساس روش شرح داده شده به وسیله لیندمو درصد ایمونوراکتیویته آنتی‌بادی نشان‌دار شده به دست آمد [۱۹].

۷-۲ نشان‌دارسازی قطعات $F(ab)_2$ آنتی‌بادی مونوکلونال PR81 با ^{99m}Tc

در این مرحله به منظور دست‌یابی به کمپلکسی پایدارتر و حفظ هر چه بیش‌تر ایمونوراکتیویته آنتی‌بادی در طی مراحل نشان‌دارسازی از HYNIC به عنوان عامل کی‌لیت‌ساز دو منظوره و از تریسین به عنوان کولیگاند برای نشان‌دارسازی آنتی‌بادی با ^{99m}Tc استفاده شد [۲۰]. بدین منظور بافر آنتی‌بادی (بافر فسفات سالین) با بافر بورات ۰/۱ مولار با pH=۸/۵ به روش دیالیز تعویض گردید. کی‌لیت‌ساز HYNIC با غلظت ۳۰ میلی‌مول بر لیتر در دی‌متیل سولفوکسید به آنتی‌بادی به نسبت ۵۰ برابر مولی افزوده شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. بافر آنتی‌بادی (بافر بورات) با بافر سترات با pH=۵/۲ به روش دیالیز تعویض گردید. غلظت آنتی‌بادی در بافر سترات به روش لوری تعیین گردید. کولیگاند با استفاده از تریسین و کلرید قلع تهیه و ^{99m}Tc به کولیگاند اضافه گردید. کمپلکس ^{99m}Tc -Tricine به کمپلکس $F(ab)_2$ -HYNIC به نسبت ۲۰ میلی‌کوری به ازاء هر یک میلی‌گرم آنتی‌بادی افزوده شد.



۸-۲ کنترل کیفی آنتی‌بادی نشان‌دار شده

برای بررسی خصوصیات قطعات $F(ab')_2$ نشان‌دار شده با ^{99m}Tc ، آزمایش‌های زیر انجام شد [۲۱، ۲۲ و ۲۳].

۱-۸-۲ تعیین خلوص رادیوشیمیایی و پایداری در دمای محیط

در این تحقیق برای تعیین خلوص رادیوشیمیایی از روش ITLC-SG با فاز متحرک سالین نرمال استفاده شد. روش کار بدین صورت است که ورقه‌ی سیلیکاژل به ابعاد $14\text{cm} \times 1\text{cm}$ بریده شده و به فاصله‌ی 1.5cm از ابتدای آن نمونه‌گذاری ($5\mu\text{l}$) انجام شد. پس از خشک شدن نمونه، ورقه برای جداسازی در تانک محتوی سالین نرمال قرار گرفت. بعد از طی حدود 10cm توسط فاز متحرک، به ورقه فرصت داده شد تا خشک شود. آن گاه ورقه به قطعات 1cm بریده شد و مقدار فعالیت در هر قطعه توسط شمارگر گاما شمارش گردید. مجموع فعالیت موجود در دو سانتی‌متر اول به فعالیت کل تقسیم شد تا بازده نشان‌دارسازی به دست آید. بازده نشان‌دارسازی در مقاطع زمانی 0.5 ، 1 ، 2 ، 4 ، 6 ، 8 و 24 ساعت پس از شروع واکنش نشان‌دارسازی تعیین شد. برای افزایش خلوص رادیوشیمیایی، محصول تولیدی یک ساعت پس از شروع واکنش نشان‌دارسازی از ستون کروماتوگرافی ژلی عبور داده شد.

۲-۸-۲ بررسی پایداری قطعات $F(ab')_2$ نشان‌دار شده در سرم خون انسان

برای بررسی پایداری فرآورده‌ی تولید شده در سرم خون انسان پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد از دستگاه FPLC استفاده شد. در این روش از ستون کروماتوگرافی غربالی (Superose 12 HR 10/30) به عنوان فاز ساکن و از بافر فسفات 0.01 مولار با $\text{pH}=7$ به عنوان فاز متحرک استفاده شد. 100 میکرولیتر از مخلوط $F(ab')_2$ نشان‌دار شده و سرم تازه‌ی خون انسان با غلظت $1\mu\text{g/ml}$ روی ستون ریخته شد و با جریان 1ml/min و توسط آشکارساز فرابنفش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جزءهای 1 میلی‌لیتری جمع‌آوری و جداگانه با دستگاه شمارش گاما مورد شمارش قرار گرفتند.

۳-۸-۲ بررسی توزیع حیاتی قطعات $F(ab')_2$ نشان‌دار شده در موش‌های BALB/c مبتلا به سرطان سینه

تومور سینه‌ی تهیه‌ی شده از یک موش مبتلا به کارسینومای طبیعی سینه در پهلوی چپ ۳ گروه ۵ تایی از موش‌های BALB/c ماده پیوند زده شد. پس از رشد تومورها تا به حدود 1 سانتی‌متر مکعب (پس از گذشت ۳ هفته از زمان پیوند)، قطعات $F(ab')_2$ با ^{99m}Tc HYNIC نشان‌دار گردید و پس از تخلیص، از طریق ورید دم به موش‌های مبتلا به تومور سینه (هر موش 10 تا 15 میکروگرم آنتی‌بادی، 200 تا 300 میکروکوری فعالیت در حجم کلی 100 تا 200 میکرولیتر) تزریق گردید. 4 ، 8 و 24 ساعت پس از تزریق آنتی‌بادی نشان‌دار، موش‌ها قربانی شدند و اعضاء بدن آن‌ها شامل خون، کبد، طحال، کلیه، معده، روده‌ها، قلب، عضله، استخوان و ... به علاوه تومور در هر یک از ساعت‌ها بیرون آورده شدند و پس از توزین، فعالیت آن‌ها با استفاده از دستگاه شمارنده گاما شمارش و درصد جذب شده در هر گرم از بافت‌ها ($\%ID/g$) مشخص گردید. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری‌ها برای هر ارگان، میانگین‌گیری و انحراف معیار آن‌ها تعیین گردید.

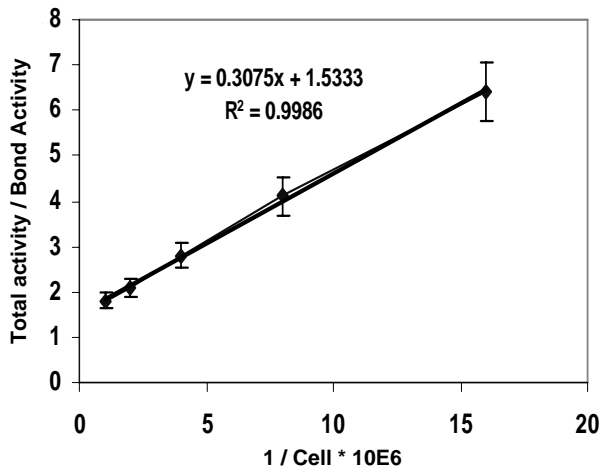
۲-۹-۲ رادیوایمونوسیتوگرافی

برای این منظور مشابه بخش ۲-۸-۳ عمل شد با این تفاوت که این بار، 4 ، 8 و 24 ساعت پس از تزریق آنتی‌بادی نشان‌دار، به جای قربانی کردن موش‌ها از بدن آن‌ها با استفاده از دوربین گاما با هد مضاعف، موازی‌ساز همه منظوره و کم‌انرژی تصویربرداری قدامی و خلفی (جمع‌آوری 20 هزار شمارش برای هر نما) به عمل آمد.

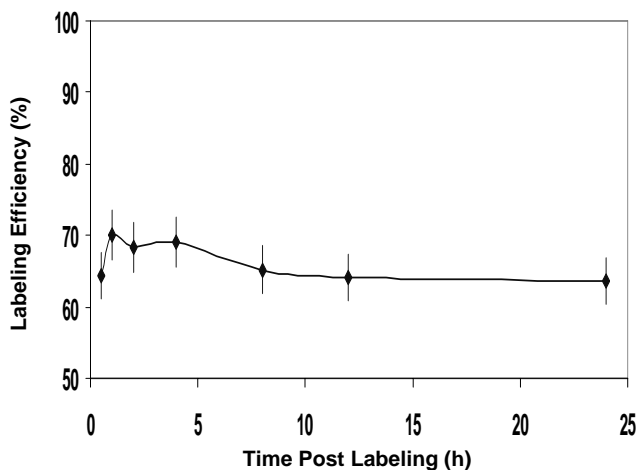
۳- نتایج

۳-۱-۳ هضم آنتی‌بادی

با توجه به آزمایش‌های به عمل آمده به روش SDS-PAGE مشخص گردید که زمان بهینه برای هضم آنتی‌بادی PR81 با نسبت مولی 1 به 20 (آنزیم به آنتی‌بادی) 28 ساعت پس از شروع واکنش است (شکل ۱). زیرا با گذشت این مدت تقریباً مولکولی از IgG در محیط باقی نمی‌ماند و همگی آن‌ها کاملاً به $F(ab')_2$ تبدیل می‌شوند. ادامه‌ی واکنش هضم به کاهش بیش‌تر ایمونواکتیویته آنتی‌بادی منجر خواهد گردید. خلوص قطعات $F(ab')_2$ با استفاده از روش SDS-PAGE بیش از 95% به دست آمد (شکل ۱).



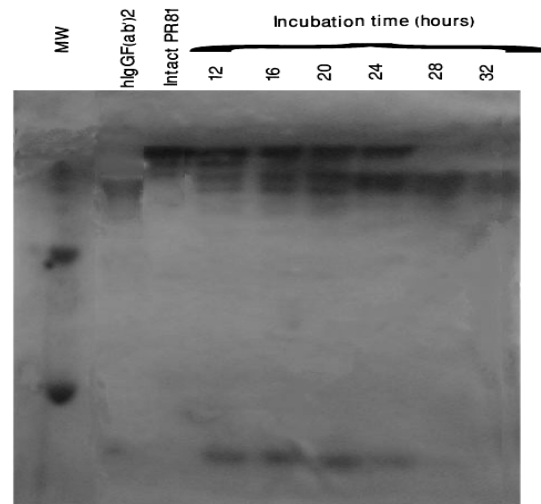
شکل ۲- نمودار ایمونورآکتیویته در مورد توانایی کمپلکس تهیه شده در اتصال به سلول‌های MCF7.



شکل ۳- نمودار بازده نشان‌دارسازی قطعه‌ی $F(ab)'_2$ آنتی‌بادی PR81 با ^{99m}Tc با استفاده از HYNIC در مدت ۲۴ ساعت پس از شروع واکنش در دمای اتاق.

۳-۴ پایداری قطعات نشان‌دار شده در سرم خون انسان

نتایج کروماتوگرافی غربالی نشان داد که $5 \pm 55\%$ از کل فعالیت پرتوزایی به یک قله‌ی همگن با یک زمان بازداری مشابه با آنتی‌بادی نشان‌دار نشده مربوط است. این نتایج پایداری آنتی‌بادی نشان‌دار شده در سرم خون انسان و در نتیجه مطلوب بودن فرآورده‌ی تولید شده برای مطالعات رادیوایمونوسیتی‌گرافی را نشان می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۱- الکتروفورز پلی‌آکریل‌آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات فرآورده‌ی هضم آنتی‌بادی PR81 با رنگ‌آمیزی کوماسی آبی. ستون اول: استانداردهای وزن مولکولی (MW)، ستون دوم: $F(ab)'_2$ تهیه شده از hIgG به عنوان شاهد، ستون سوم: آنتی‌بادی PR81 دست نخورده، ستون چهارم تا نهم: آنتی‌بادی هضم شده توسط آنزیم پیسین در زمان‌های ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲ ساعت پس از شروع واکنش هضم.

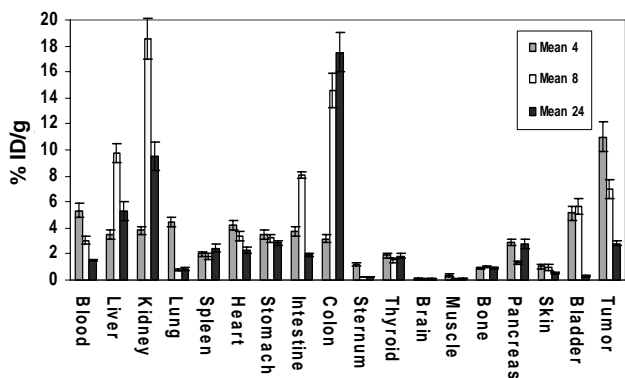
۳-۲ ایمونورآکتیویته‌ی قطعات $F(ab)'_2$ نشان‌دار شده

ایمونورآکتیویته‌ی قطعات $F(ab)'_2$ آنتی‌بادی PR81 با استفاده از روش لیندمو، $1.65 \pm 5.1\%$ به دست آمد. زیرا عرض از مبدا در شکل ۲ برابر 1.53 است و طبق تعریف عکس این مقدار برابر ایمونورآکتیویته است (شکل ۲).

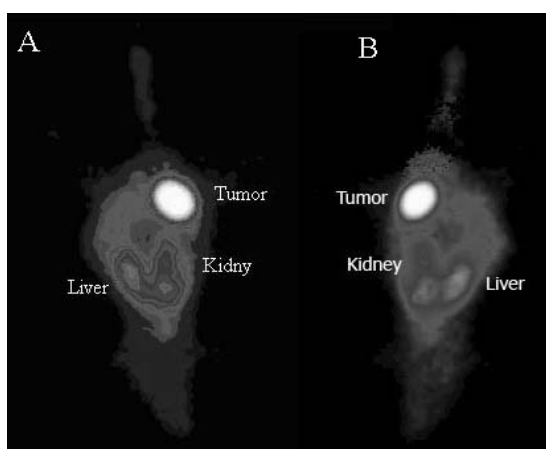
۳-۳ خلوص رادیوشیمیایی و پایداری در دمای محیط

با استفاده از روش ITLC-SG، خلوص رادیوشیمیایی در فاصله‌های زمانی ۰.۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۲۴ ساعت پس از شروع واکنش تعیین شد. نتایج حاصل نشان داد که بازده نشان‌دارسازی ظرف یک ساعت پس از شروع واکنش به $70.1 \pm 5.2\%$ می‌رسد و کمپلکس تهیه شده در طول ۲۴ ساعت پس از شروع واکنش از پایداری مناسبی برخوردار است. در شکل ۳ بازده نشان‌دارسازی قطعات $F(ab)'_2$ در زمان‌های مختلف پس از شروع نشان‌دارسازی در دمای محیط نشان داده شده است.

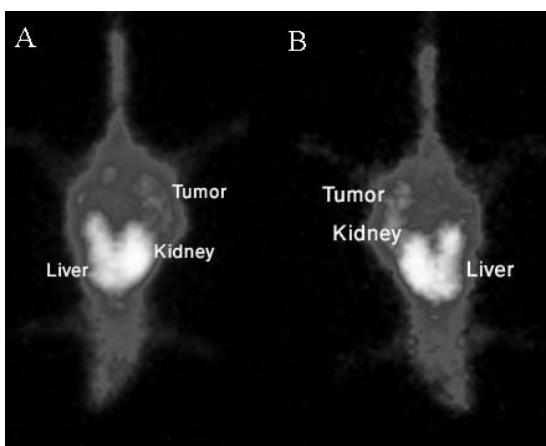
با استفاده از روش ITLC-SG، خلوص رادیوشیمیایی محصول تولیدی پس از تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی ژلی $93 \pm 5.1\%$ تعیین گردید.



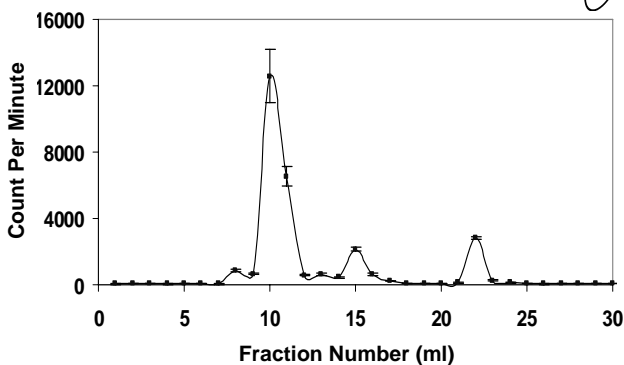
شکل ۵- توزیع زیستی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)2}$ برحسب متوسط درصد دز تزریق شده در هر گرم از بافت (%ID/g) در موش‌های BALB/c مبتلا به تومور سینه، ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق.



شکل ۶- تصاویر سینتی گرافی قدامی (سمت چپ) و خلفی (سمت راست) کل بدن یک موش BALB/c مبتلا به تومور سینه‌ی پیوندی در ناحیه‌ی پهلوی چپ که ۴ ساعت پس از تزریق وریدی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)2}$ تهیه شده است.



شکل ۷- تصاویر سینتی گرافی قدامی (سمت چپ) و خلفی (سمت راست) کل بدن یک موش BALB/c مبتلا به تومور سینه‌ی پیوندی در ناحیه‌ی پهلوی چپ که ۸ ساعت پس از تزریق وریدی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)2}$ تهیه شده است.



شکل ۴- رادیوکروماتوگرام غربالی کمپلکس $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)2}$ تهیه شده با دستگاه FPLC، ۲۴ ساعت پس از نگهداری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در سرم خون انسان.

۳-۵ بررسی توزیع زیستی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)2}$ در موش‌های BALB/c مبتلا به تومور سینه

شکل ۵ نتایج حاصل از توزیع زیستی $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)2}$ در موش‌های BALB/c مبتلا به تومور سینه را ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق وریدی برحسب متوسط درصد دز تزریق شده در هر گرم از بافت نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که کمپلکس تهیه شده ۴ ساعت پس از تزریق به میزان بالایی نسبت به سایر بافت‌های طبیعی در تومور سینه تجمع یافته است.

۳-۶ رادیوایمونوسینتی گرافی

نتایج سینتی گرافی موش‌های BALB/c ماده‌ی مبتلا به تومور سینه‌ی پیوندی نشان داد که کمپلکس تهیه شده ۴ ساعت پس از تزریق با حساسیت بالایی در تومور تجمع یافته است. شکل‌های ۶، ۷ و ۸ تصاویر سینتی گرافی قدامی و خلفی کل بدن یک موش BALB/c مبتلا به تومور سینه‌ی پیوندی را به ترتیب، در زمان‌های ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق نشان می‌دهند.

۴- بحث و نتیجه‌گیری

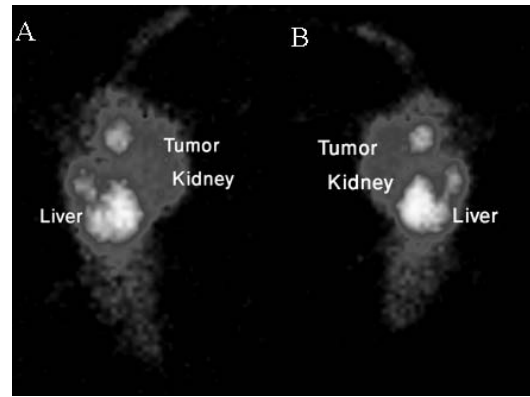
آنتی‌بادی PR81 از نوع IgG1 با زنجیره‌ی کاپا (k) می‌باشد که با پروتئین‌های غشایی استخراج شده از بافت سینه واکنش داده و میزان واکنش‌دهندگی آن در حالت‌های سرطانی بدخیم نسبت به بافت‌های سرطانی خوش خیم و سالم بیشتر است [۲]. نشان‌دارسازی PR81 کامل با ^{99m}Tc به روش‌های مستقیم و غیرمستقیم توسط صلوتی و همکارانش انجام و با موفقیت در مطالعات رادیوایمونوسینتی گرافی مدل موشی مبتلا به تومور سینه مورد آزمایش قرار گرفته است [۳ تا ۶]. با این وجود تزریق



خلوص بالا در فاصله‌ی زمان کوتاه می‌شود [۲۷]. در این پژوهش ما توانستیم، قطعه‌ی $F(ab')_2$ آنتی‌بادی PR81 را با ^{99m}Tc با خلوص رادیوشیمیایی $2/5 \pm 70/1\%$ نشان‌دار کنیم. این روش در مقایسه با روش‌های مستقیم نشان‌دارسازی نه تنها تمامی خصوصیات لازم روش‌های نشان‌دارسازی را دارا است بلکه به دلیل اتصال با واسطه‌ی ^{99m}Tc به آنتی‌بادی، قدرت اتصالی آنتی‌بادی تغییر نمی‌کند. با توجه به کم بودن خلوص رادیوشیمیایی محصول تولیدی جهت مطالعات تصویربرداری و توزیع زیستی، محصول تولیدی با استفاده از کروماتوگرافی ژلی تخلیص گردید.

به طور کلی وقتی آنتی‌بادی‌ها یا قطعات آن‌ها با روش‌های مختلف نشان‌دار می‌شوند، باید به صورت برون تنی و درون تنی مورد آزمایش و کنترل کیفی قرار گیرند تا بدین وسیله از پایداری آن‌ها در محیط و در سیستم زیست‌شناختی اطمینان حاصل شده و معلوم گردد که خصوصیات فارماکوکینتیکی کمپلکس تهیه شده در طی پروسه نشان‌دارسازی محفوظ باقی می‌ماند. یکی از عوامل مهم در آزمون‌های برون تنی، ایمونورآکتیویته‌ی آنتی‌بادی نشان‌دار شده است، زیرا شرط اساسی برای داشتن یک اسکن مناسب از تومورهای سرطانی، محفوظ ماندن خصوصیات مصونیتی آنتی‌بادی طی پروسه‌های نشان‌دارسازی است، در غیر این صورت با کاهش ایمونورآکتیویته‌ی آنتی‌بادی نشان‌دار شده، فعالیت پرتوزایی موجود در بافت‌های طبیعی افزایش می‌یابد. اندازه‌گیری ایمونورآکتیویته‌ی قطعات $F(ab')_2$ با استفاده از روش لیندمو کاهش قابل ملاحظه‌ای را در ایمونورآکتیویته‌ی آنتی‌بادی نشان‌دار شده نشان نداد.

در مرحله‌ی بعدی به منظور بررسی میزان جذب توموری کمپلکس تهیه شده و نیز مطالعات تصویربرداری نیاز به یک مدل حیوانی مبتلا به تومور سینه داشتیم [۲۸]. در این تحقیق از روش تولید تومور سینه از راه پیوند بافت توموری از موش BALB/c ماده‌ی مبتلا به کارسینومای طبیعی سینه به موش‌های هم‌خون استفاده کردیم [۱۳]. سپس با نشان‌دارسازی قطعه‌ی $F(ab')_2$ آنتی‌بادی PR81، تخلیص آن و تزریق ماده‌ی تولیدی به موش‌های مبتلا به تومور سینه‌ی پیوندی، مطالعات تصویربرداری و آزمایش‌های توزیع زیستی بر روی مدل موشی انجام شد. مطالعات تصویربرداری در زمان‌های ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق ^{99m}Tc -HYNIC- $F(ab')_2$ نشان داد که آنتی‌بادی



شکل ۸- تصاویر سینتی‌گرافی قدامی (سمت چپ) و خلفی (سمت راست) کل بدن یک موش BALB/c ماده‌ی مبتلا به تومور سینه‌ی پیوندی در ناحیه‌ی پهلوی چپ که ۲۴ ساعت پس از تزریق وریدی ^{99m}Tc -HYNIC- $F(ab')_2$ گرفته شده است.

آنتی‌بادی PR81 به صورت کامل به انسان ممکن است به دلیل موشی بودن آن منجر به واکنش‌های آلرژیک (HAMA) شود [۷]. لذا ضروری است قبل از کاربرد آنتی‌بادی PR81 در انسان، هضم آنتی‌بادی به منظور تهیه‌ی قطعات $F(ab')_2$ با توجه به این که این قطعات نسبت به آنتی‌بادی کامل از ایمنی‌زایی کم‌تر و پاک‌سازی بالاتر از کلیه‌ها برخوردارند، انجام شود [۱۴، ۱۵ و ۲۳]. هم‌چنین با توجه به این که نیم-عمر پلاسمایی مولکول کامل ایمونوگلوبولین بسیار طولانی‌تر از نیم-عمر فیزیکی ^{99m}Tc می‌باشد، بهتر است از قطعات آنتی‌بادی با وزن مولکولی کم‌تر استفاده شود تا بین نیم-عمر آن‌ها اختلاف چشم‌گیری وجود نداشته باشد [۲۴].

ساده‌ترین روش برای نشان‌دار ساختن آنتی‌بادی‌ها، روش مستقیم است که در طی آن پیوندهای دی‌سولفیدی در مولکول ایمونوگلوبولین توسط یک کاهنده‌ی ملایم، کاهیده شده و به گروه‌های سولفیدریل تبدیل می‌شوند، سپس ^{99m}Tc از طریق این گروه‌ها به آنتی‌بادی متصل می‌گردد [۲۵]. اما متأسفانه این روش برای نشان‌دارسازی قطعات $F(ab')_2$ قابل استفاده نیست [۲۶]. بدین منظور نشان‌دارسازی قطعه‌ی آنتی‌بادی با ^{99m}Tc به روش غیرمستقیم و با استفاده از HYNIC به عنوان کی‌لیت‌ساز مطرح گردید. از آن جایی که HYNIC به صورت یک لیگاند عمل می‌کند، وجود یک کولیگاند مثل EDDA و یا تراپسین نیز برای تکمیل کردن حلقه‌ی اتصالی به ^{99m}Tc ضروری است. در این تحقیق ما از تراپسین به عنوان کولیگاند استفاده کردیم زیرا بر طبق مطالعات انجام شده منجر به بازده نشان‌دارسازی آنتی‌بادی با



جدول ۱- نسبت فعالیت پرتوزایی تومور به اندام‌های حیاتی بدن در زمان‌های ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق کمپلکس $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)'}_2$

اندام	بافت سالم / تومور ۴ ساعت پس از تزریق	بافت سالم / تومور ۸ ساعت پس از تزریق	بافت سالم / تومور ۲۴ ساعت پس از تزریق
خون	۲,۰۵	۲,۲۶	۱,۸۸
کبد	۳,۱۲	۰,۷۱	۰,۵۳
کلیه	۲,۸۷	۰,۶۰	۰,۲۹
قلب	۲,۵۹	۲,۰۹	۱,۲۲
میانگین	۲,۶۶	۱,۴۲	۰,۹۸
انحراف معیار	۰,۴۵	۰,۸۸	۰,۷۱

مقایسه‌ی میزان تجمع توموری آنتی‌بادی نشان‌دار شده با استفاده از آنتی‌بادی کامل [۵ و ۶] و قطعه‌ی آنتی‌بادی در مطالعات توزیع زیستی در موش‌های BALB/c مبتلا به تومور پستان نشان‌دهنده‌ی تفاوت قابل‌ملاحظه در آشکارسازی تومور پستان در مدل حیوانی بین این دو روش نیست. با این وجود آشکارسازی تومور ۴ ساعت پس از تزریق با استفاده از قطعه‌ی آنتی‌بادی در مقایسه با ۲۴ ساعت زمان مورد نیاز جهت تصویربرداری از تومور با استفاده از آنتی‌بادی کامل با توجه به نیم-عمر پایین ^{99m}Tc و نیز عدم ایمنولوژیک بودن قطعه آنتی‌بادی در مقایسه با آنتی‌بادی کامل از مزایای رادیوداروی جدید است که در تصویربرداری از سرطان سینه‌ی انسان بسیار تأثیرگذار خواهد بود.

در تحقیق حاضر به دلیل فعالیت پرتوزایی پایین تزریقی قادر به تصویربرداری به صورت SPECT نبودیم و تنها از سیستم Planar به صورت استاتیک برای تصویربرداری تمام بدن استفاده گردید. در تصویربرداری planar از تمام فیلترهای موجود در سیستم شامل Metz، Wiener، Butterworth استفاده شد. اما هیچ کدام تغییر محسوس و معنی‌داری در کیفیت تصویر ایجاد نکردند. لذا ترجیح داده شد که تصاویر بدون فیلتراسیون مورد بررسی قرار گیرند.

نتایج به دست آمده نشان‌دهنده‌ی این است که قطعات $^{99m}\text{Tc-F(ab)'}_2$ آنتی‌بادی مونوکلونال PR81، به دلیل کاهش سریع فعالیت پرتوزایی زمینه به جهت دفع سریع‌تر از بدن توسط کلیه‌ها، جذب سریع‌تر در تومور، استفاده از مقادیر کم‌تر فعالیت پرتوزایی و کم‌تر بودن پاسخ HAMA، کاندیدای مطلوبی نسبت به PR81 کامل برای مطالعات رادیوایمونوسیتی گرافی از سرطان سینه‌ی انسان است.

نشان‌دار شده با حساسیت بالای ۴ ساعت پس از تزریق کمپلکس در تومور سینه تجمع می‌یابد. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد تجمع آنتی‌بادی نشان‌دار شده در تومور سینه از همان ساعات اولیه‌ی پس از تزریق قابل‌ملاحظه است و با افزایش زمان و احتمالاً به دلیل جدا شدن تدریجی قطعه‌ی آنتی‌بادی از تومور، فعالیت پرتوزایی تومور از ساعت هشتم پس از تزریق کاهش می‌یابد و تفاوت فعالیت پرتوزایی تومور با سایر ارگان‌ها رو به کاهش می‌گذارد که این تفاوت ۲۴ ساعت پس از تزریق به حداقل می‌رسد. آشکارسازی تومور در طی تنها ۴ ساعت پس از تزریق رادیودارو که مزیتی بسیار ارزشمند به دلیل نیم-عمر پایین ^{99m}Tc است، همراه با کاهش زمان تصویربرداری از حدود ۴۵ دقیقه در تصویربرداری با استفاده از آنتی‌بادی کامل (نتایج به دست آمده در مطالعات صلوتی و همکاران) به حدود ۱۵ دقیقه همراه با عدم ایمنولوژیک بودن قطعات آنتی‌بادی به منظور کاربرد این رادیودارو در آینده در انسان می‌تواند از مزایای بسیار مهم رادیوداروی تولید شده در این تحقیق نسبت به آنتی‌بادی کامل باشد.

در ادامه برای تأیید مطالعات تصویربرداری و اثبات تجمع بالای کمپلکس تولیدی در تومور نسبت به سایر بافت‌ها آزمایش بررسی توزیع زیستی آنتی‌بادی نشان‌دار شده در موش‌های مبتلا به تومور سینه ۴، ۸ و ۲۴ ساعت پس از تزریق $^{99m}\text{Tc-HYNIC-F(ab)'}_2$ انجام شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که ماده‌ی نشان‌دار شده از همان ساعات اولیه به میزان بالایی در تومور سینه (نسبت به سایر بافت‌ها) تجمع می‌یابد و در ساعت‌های بعدی پس از تزریق، این تفاوت رو به کاهش می‌گذارد که تأییدکننده‌ی مطالعات تصویربرداری است. بر طبق مطالعات انجام شده در مورد تصویربرداری از تومور به روش رادیوایمونوسیتی گرافی، نسبت فعالیت پرتوزایی ۱/۵ تا ۲ تومور به بافت‌های مجاور قابل‌قبول است [۱۵]. در این مطالعه میانگین نسبت جذب تومور به اندام‌های حیاتی در ۴ ساعت پس از تزریق $2,66 \pm 0,45$ به دست آمد. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است این نسبت در ساعت‌های بعدی کاهش یافت. میزان بالای فعالیت پرتوزایی در کبد به علت سوخت و ساز آنتی‌بادی نشان‌دار شده در کبد است. وجود فعالیت پرتوزایی در کلیه‌ها و روده‌ها به علت آزاد شدن تکنسیم در فرایند سوخت و ساز و دفع آن از طریق کلیه‌ها و روده‌ها است [۲۹].



1- Human Anti-Murine Antibody Response

References:

1. م. عامل بارز، "بررسی ارتباط سقط و ابتلا به سرطان"، پایان‌نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد مامایی، دانشگاه تربیت مدرس (سال ۱۳۸۲).
2. M. Paknejad, M.J. Rasaee, F. Karami, S. Kashanian, M.A. Mohagheghi, K. Omidfar, "Production of monoclonal antibody, PR81, recognizing the tandem repeat region of MUC1 mucin," *Hybridoma and Hybridomics*, 22(3): 153-158 (2003).
3. M. Salouti, H. Rajabi, H. Babaei, M.J. Rasaee, R. Najafi, M. Paknejad, Z. Mohammad Hasan, T.M. Altarihi, "^{99m}Tc direct radiolabeling of PR81, a new anti-MUC1 monoclonal antibody for radioimmunosciintigraphy," *Iran J. N. M.*, 23: 7-16 (2005).
4. M. Salouti, H. Rajabi, M.H. Babaei, M.J. Rasaee, R. Najafi, M. Paknejad, Z. Mohammad Hasan, T.M. Altarihi, J. Mohammad Nejad, "A New Monoclonal Antibody Radiopharmaceutical for Radioimmunosciintigraphy of Breast Cancer: Direct Labeling of Antibody and Its Quality Control," *DARU*; 14(1): 14-19 (2006).
5. M. Salouti, H. Rajabi, M.H. Babaei, M.J. Rasaee, R. Najafi, M. Shafiee, M. Mazidi, Z.M. Hasan, A. Bitarafan Rajabi, N. Namvar, T.M. Altarihi, Mohammad Nejad, "Radioimmunosciintigraphy of Breast Tumor Xenografts in mouse model by ^{99m}Tc Direct Radiolabeling of a Monoclonal Antibody PR81," *The Iranian Journal of Medical Physics*, 2(8): 27-34, 60 (2005).
6. M. Salouti, H. Rajabi, M.H. Babaei, M.J. Rasaee, R. Najafi, M. Shafiee, M. Mazidi, Z.M. Hasan, A. Bitarafan Rajabi, N. Namvar, T.M. Altarihi, Mohammad Nejad,
7. S. Potamianos, A.D. Varvarigou, S.C. Archimandritis, "Radioimmunosciintigraphy and radioimmunotherapy in cancer: principles and application," *Anticancer Research*, 20: 925-948 (2000).
8. M. Mariani, M. Camagna, L. Tarditi, E. Seccamani, "A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab')₂ suitable for clinical use from mouse IgG1," *Molecular Immunology*, 28(1/2): 69-77 (1991).
9. D.W. Rea, M.E. Ultee, "A novel method for controlling the pepsin digestion of antibodies," *JIM*, 157: 165-173 (1993).
10. S. Demignot, M.C. Garnett, R.W. Baldwin, "Mouse IgG2b monoclonal antibody fragmentation. Preparation and purification of Fab, Fc and Fab/c fragments," *JIM*, 121: 209-217 (1989).
11. D.E. Milenic, J.M. Esteban, D. Colcher, "Comparison of methods for the generation of immunoreactive fragments of a monoclonal antibody (B72.3) reactive with human carcinomas," *JIM*, 120: 71-83 (1989).
12. R. Kurkela, L. Vuolas, P. Vihko, "Preparation of F(ab')₂ fragments from monoclonal mouse IgG1 suitable for use in radioimmunoimaging," *JIM*, 110: 229-236 (1988).
13. T. Ghazanfari, Z. Mohammad, R. Yaraie, "Recognition and determination of immunogenicity of a spontaneous tumor in a BALB/c mouse," *Daneshvar*, 24: 65-72 (1998).
14. B.A. Rhodes, D.A. Torvestad, K. Breslow, "^{99m}Tc labeling and acceptance testing of radiolabeled antibodies and antibody fragments. In: Burchell SW, Rhodes BA, editors. *Tumor Imaging*. New York: Mason, 111 (1982).
15. M.H. Babaei, R. Farshidfar, R. Najafi, "Evaluation of tumor targeting with radiolabeled F(AB')₂ fragment of a humanized monoclonal antibody," *DARU*, 10(2): 49-53 (2002).
16. T.M. Behr, S. Memtsoudis, R.M. Sharkey, R.D. Blumenthal, R.M. Dunn, S. Gratz, "Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immunotherapy: influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy," *Int. J. Cancer*, 77: 787-795 (1998).



- 17.R. Kurkela, L. Vuolas, P. Vihko, "Preparation of F(ab')₂ fragments from monoclonal mouse IgG1 suitable for use in radioimaging," *JIM*, 110: 229-236 (1988).
- 18.H.J. Haisma, J. Hilgers, V.R. Zurawski, "Iodination of monoclonal antibodies for diagnosis and radiotherapy using a convenient one vial method," *J. Nucl. Med.* 27: 1890-1895 (1986).
- 19.T. Lindmo, E. Boven, F. Cuttitta, J. Fedorko, P.J. Bunn, "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation of binding at infinite antigen excess," *J. Immunol Methods*, 65: 55-63 (1983).
- 20.M.J. Abrams, M. Juweid, C.I. TenKate, "Technetium-99m human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats," *J. Nucl. Med.* 31: 2022-2028 (1990).
- 21.A. Johnstone, R. Thorpe, "Basic techniques. In: Johnstone A, Thorpe R, editors. *Immunochemistry in practice*. Blackwell Science Ltd, 1-34 (1996).
- 22.H.J. Lee, W. Pardridge, "Monoclonal antibody radiopharmaceuticals: cationization, pegylation, radiometal chelation, pharmacokinetics, and tumor imaging," *Bioconjugate Chem*, 14: 546-553 (2003).
- 23.M.J. Verhaar, B.A. Zonnenberg, J.M.H. Klerk, G.H. Blijham, "Radioimmunodiagnosis and therapy," *Cancer Treatment Reviews*, 26: 3-10 (2000).
- 24.Y. Yamaguchi, H. Kim, K. Kato, K. Masuda, I. Shimada, Y. Arata, "Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin," *G. JIM*, 181: 259-267 (1995).
- 25.L.M. Lamki, "Radioimmiscintigraphy of cancer, problems, pitfalls and prospects. In: Freeman, L.M. (ed) *Nuclear Medicine Annual 1990*, Raven Press, New York, 113-150 (1990).
- 26.A.M. Verbruggen, "Radiopharmaceuticals: state of the art," *Eur. J. Nucl. Med.* 17: 346-364 (1990).
- 27.S.W. Schwarz, J.M. Connett, C.J. Anderson, et al, "Evaluation of a direct method for technetium labeling intact and F(ab')₂ 1A3, an anticolorectal monoclonal antibody," *Nucl. Med. Biol.* 21: 619-626 (1994).
- 28.S.K. Larsen, G. Caldwell, J.D. Higgins, M.S. Abram, H.F. Solomon, "Technetium complex of tricine: useful precursor for the 99mTc labelling of hydrazino nicotinamide modified proteins," *J. Label Compd Radiopharm*, 35: 1-2 (1994).
- 29.B.W. Wessels, "Current status of animal radioimmunotherapy," *Cancer Res*, 50, 970-973 (1990).