

ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CEA IOR-1 MARCADO COM ^{99m}Tc

Carla Roberta de B. R. Dias, Rosana Herrerias, José Antônio Pires, Dulcila M. L. Bernardes, Marycel F. de Barboza, Constância P. G. da Silva

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Av. Lineu Prestes 2.242
05508-900 Butantã, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O anti-CEA IOR-1 (Centis Cuba) é um anticorpo monoclonal contra antígeno carcinoembrionário do carcinoma do cólon. Marcado com ^{99m}Tc tem como principal aplicação em Medicina Nuclear: no estadiamento, detecção e avaliação de recidivas tumorais, especialmente aquelas do trato gastrointestinal. Objetiva-se neste trabalho determinar se o anticorpo, uma vez radiomarcado, conserva suas propriedades imunorreativas. Após a redução, purificação e avaliação da fração protéica do anti-CEA IOR-1 deve-se posteriormente realizar a marcação com pertecnetato (^{99m}Tc), via redução com Sn^{++} , na presença de um quelante fraco: metileno difosfonato (MDP) e analisar a imunorreatividade. A determinação da imunorreatividade é realizada por métodos quantitativos e qualitativos de imunoenálise. Este foi o método adotado, utilizando-se cromatografia de afinidade em camada delgada. Um rendimento de 60% foi obtido, mostrando afinidade anticorpo-antígeno.

Keywords: immunoreactivity, colon carcinoma, nuclear medicine, monoclonal antibody.

I. INTRODUÇÃO

Os anticorpos monoclonais (AcM) contra alguns antígenos associados a tumores conduzem à possibilidade prática de preparar anticorpos radiomarcados, altamente específicos, utilizados como radiofármacos no diagnóstico e terapia de câncer em humanos[1]. A preparação do radiofármaco depende de um sistema de marcação que conduza a uma ligação específica com o radionúclideo selecionado e que não danifique o sítio de ligação do AcM com o antígeno[2].

Diferentes radionúclideos foram estudados para a marcação de AcM[3], sendo o ^{99m}Tc o radionúclideo ideal utilizado no diagnóstico clínico em medicina nuclear, devido a sua disponibilidade na forma de gerador ^{99}Mo - ^{99m}Tc [4], de baixo custo, propriedades físicas apropriadas com um fóton de 140 keV e uma meia vida de 6 horas. Os métodos usados para a marcação de AcM com ^{99m}Tc podem ser por meio de técnicas diretas (acoplamento direto na molécula) ou indiretas (acoplamento por meio de outro composto que funciona como ponte)[5].

A determinação da fração imunorreativa, que é a porcentagem do anticorpo radiomarcado que mantém a sua especificidade original de ligação ao antígeno, é uma importante medida do controle de qualidade[6].

O objetivo deste trabalho é analisar por métodos quantitativos e qualitativos a imunorreatividade do anticorpo anti-CEA IOR-1 marcado com ^{99m}Tc .

II. PARTE EXPERIMENTAL

Marcação: Após a redução, purificação e avaliação da fração protéica do anti-CEA IOR-1 no espectrofotômetro, as frações concentradas em 1mg/ml foram utilizadas para a marcação direta pela adição de pertecnetato de sódio ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), via redução com Sn^{++} , na presença de um quelante fraco – metileno difosfonato (MDP). Os tempos estudados foram 15, 30 e 60 minutos.

Controle Radioquímico: Para determinar a pureza radioquímica foram utilizadas: fitas cromatográficas de papel Whatman 1; Whatman 3MM (1 x 10 cm); ITLC-SG (Al) e TLC fibra de vidro embebida em albumina 5% (2 x 10 cm), nos solventes: metililcetona (MEK), solução salina (NaCl 0,9%) e ETOH:NH₄OH:H₂O (2:1:5).

Controle de imunorreatividade: Para a determinação da fração imunorreativa utilizou-se cromatografia em camada delgada seguindo o seguinte método[6]:

1 - Preparo das fitas cromatográficas:

- ◆ Ativar as fitas cromatográficas de fibra de vidro (1 x 10 cm) impregnadas de sílica gel (ITLC-SG) durante 30 minutos por aquecimento a 110 °C;
- ◆ Preparar as fitas com antígeno positivo semeando 200 µl do antígeno CEA (10 µg/ml) sobre as fitas de ITLC-SG ativadas, à aproximadamente 3 cm da parte inferior,

deixando-se 20 segundos para o antígeno se impregnar na fita cromatográfica;

- ◆ Posteriormente, submergir as fitas completamente por 2 segundos em uma solução de soro albumina humano (5 mg/ml) em salina 0,9%, retirar as fitas e deixar que a solução se impregne por 20 segundos;
- ◆ Enxaguar as fitas com água bidestilada e secar com ar frio;
- ◆ Colocar as fitas em uma estufa a 37 °C para secagem completa;
- ◆ Preparar as fitas com antígeno negativo colocando 200 µl de soro fetal bovino. Seguir o mesmo tratamento dado às fitas de antígeno positivo.

2 - Marcação do anti-CEA-1:

- ◆ Reconstituir um frasco liofilizado de anti-CEA 1 (1,0 mg AcM/frasco) com 5ml de solução de pertectinato de sódio. Alíquotas de 2µl (0,4 µg de AcM) foram diluídas em 10µl com soro fetal bovino. Colocar os 10 µl sobre as fitas tanto de antígeno positivo quanto do antígeno negativo.
- ◆ Realizar as cromatografias em tampão fosfato salina (PBS) : etanol a 4% até aproximadamente 9 cm. Cortar as fitas pela metade e determinar a porcentagem da fração imunorreativa (%FI) utilizando a fórmula (1):

$$\% \text{ FI} = (\text{O}/\text{T})100 - \% \text{ UI} \quad (1)$$

onde:

O = Atividade na origem da fita de antígeno positivo

T = Atividade total aplicada na fita de antígeno positivo

%UI (união inespecífica) = (Atividade na origem / Atividade total)100, da fita antígeno negativo, como mostra a Figura 1.

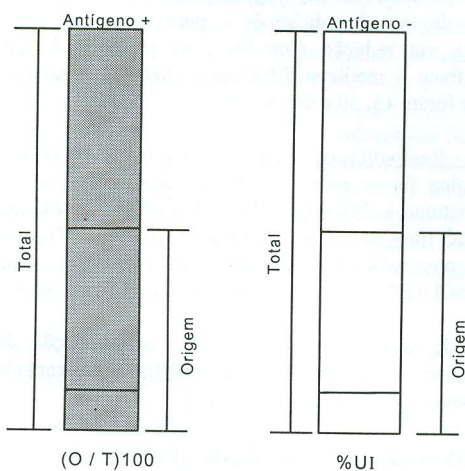


Figura 1. Determinação da porcentagem da fração imunorreativa.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios realizados na primeira parte deste trabalho definiram-se: o método de redução do anti-CEA, o método de marcação com ^{99m}Tc , os sistemas cromatográficos de controle de qualidade (radioquímico) onde os rendimentos de marcação foram superiores a 90% aos 15, 30 e 60 minutos após a adição do ^{99m}Tc , com atividades de 55,5 até 1391 MBq [7].

Os resultados das análises para este experimento mostram que há afinidade anticorpo-antígeno (Tabela 1). É muito importante que a relação molar antígeno:anticorpo mantenha-se em uma proporção mínima de 100:1. Do contrário, o anticorpo pode migrar na cromatografia e dar resultados incorretos. A %UI obtida na origem das tiras antígeno negativo, pode variar de 8% até 20%. No entanto, a %FI deve ser de aproximadamente 60% a 70%, conforme descrito no informe do protocolo modelo [6].

TABELA 1. Resultados da análise da imunorreatividade

| | O (ativ. origem - cpm) | T (ativ. total - cpm) |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| Antígeno positivo | 1525433 | 2089551 |
| Antígeno negativo | 312648 | 2323740 |
| % positivo | 73 | |
| %UI | 13 | |
| * % FI | 60 | |

* n = 5

IV. CONCLUSÃO

Verifica-se, a partir do resultado obtido que o processo de marcação foi eficiente e não causou danos à molécula do anticorpo. A porcentagem da fração imunorreativa (%FI) obtida foi de 60% e a de união inespecífica (%UI) foi de 13%, estando dentro dos padrões estabelecidos, mostrando que há afinidade antígeno-anticorpo.

AGRADECIMENTOS

À Agência Internacional de Energia Atômica – IAEA/Viena, pela participação deste trabalho no projeto ARCAL LII – “Preparación, control de calidad y validación de radiofármacos de ^{99m}Tc basados en anticuerpos monoclonales”. Agradecemos também ao CNPq, pela concessão de uma bolsa PIBIC de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

- [1] ESCOBAR, N. I.; RODRÍGUES, R. P. **Monoclonal Antibodies for immunoscintigraphy: a Revision of the Tumor-Associated Antigen Concept**, Diagnostics & Human Therapeutics.
- [2] FLESHMAN, J. W., CONNETT, J. M., NEUFELD, D. M., GARVIN, T. J.; PHILPOTT, G. W. **Tumor localization and radioimaging with mixtures of**

radioiodinated monoclonal antibodies direct to different colon cancer associated antigens, Nucl. Med. Biol., vol. 19, n° 6, p. 659-668, 1992.

[3] BRITTON, K. E., GRANOUWSKA, M.; MATHER, S. J. Radiolabelled monoclonal antibodies in oncology I. Technical aspects, Nucl. Med. Comm., vol. 12, p. 65-76, 1991.

[4] LIU, N., JIN, J., MO, S., CHEN, H., YU, Y., XU, B.; CHEN, Q. Direct ^{99m}Tc labeling of monoclonal antibodies: Evaluation of reducing agents and HPLC analysis, J. Label. Compds. Radiopharm., vol. XLI, p. 37-41, 1998.

[5] ECKELMAN, W. C.; STEIGMAN, J. Direct labeling with ^{99m}Tc , Nucl. Med. Biol., vol. 18, n° 1, p. 3-7, 1991.

[6] DIAS, C. R. B. R.; HERRERIAS, R.; BERNARDES, D. M. L.; BARBOZA, M. F.; SILVA, C. P. G. Preparação e controle de qualidade do anticorpo monoclonal IOR-CEA-1 marcado com ^{99m}Tc . III Encontro Nacional de Biociências Nucleares, Gramado, Anais, 3-6 Setembro, 2001.

[7] "Preparación, control de calidad y validación de radiofármacos de ^{99m}Tc basados en anticuerpos monoclonales" – Reunión de expertos para definir el protocolo modelo, Informe, Centro Nuclear de México 8 al 12 de Octubre, 2001. Proyecto Arcal LII – Organismo Internacional de Energía Atómica.

ABSTRACT

The anti-CEA IOR-1 (Centis Cuba) is a monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen of colon carcinoma. Labelled with ^{99m}Tc it has a main application in Nuclear Medicine: follow up, detection and evaluation of tumor recurrences, specially those of the gastrointestinal track. The objective of this work is to determine if the antibody keeps its immunoreactive properties once radiolabelled. After the reduction, purification and evaluation of the protetic – fraction of anti-CEA IOR-1 it is necessary to label with pertechnetate (^{99m}Tc) via Sn^{++} reduction in the presence of a weak chelating agent: methylene diphosphonate (MDP) and to analyse its immunoreactivity. The evaluation of the immunoreactivity is performed by quantitative and qualitative methods of immunoanalysis. This was the chosen method, employing thin layer affinity chromatography. A yield of 60% was obtained, showing the antibody – antigen affinity.