

Катарина Смилков

РАЗВОЈ И СТАНДАРДИЗАЦИЈА НА МЕТОДИ ЗА ФОРМУЛАЦИЈА НА ТЕРАПЕВТСКИ РАДИОФАРМАЦЕВТИЦИ, БАЗИРАНИ НА МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА И ПЕПТИДИ – DOTA-RITUXIMAB И СУПСТАНЦА „P“

Анстракт

Целта на овој докторски труд е да придонесе во развојот на нови радиофармацевтски формулации, преку воведување на нов модалитет на обележано химерно антителио – анти-CD20 (ритуксимаб) со Lu-177. Даден е акцент на избор на бифункционален хелирачки агенс за конјугација на антителиото и формулација на лиофилизат за непосредно обележување со именуваниот радиоизотоп, што треба да придонесе во изборот на тераписките модалитети за третман на пациенти со лимфоми (специфично, не-Хочкин лимфом). Воведена е постапка на синтеза и формулација на продукт базиран на пептид (модифицирана супстанца „P“), како и негова карактеризација и радиообележување со Tc-99m и Re-188, како дополнување на генералниот пристап на формулација и обележување на пептидни-протеински супстанции со радиоизотопи со емисија на гама (бета/гама) енергија, наменети за дијагностички и терапевтски цели.

За оваа цел, избран беше најповолен моларен сооднос за конјугација на ритуксимаб со три типа бифункционални хелирачки агенси, *p*-Bn-SCN-DOTA, *p*-Bn-SCN-DTPA и 1B4M-DTPA, 1:20, определен беше протокол за лиофилизација кој придонесува за одржување на интегритетот на имуноконјугатите, што беше потврдено со SDS-PAGE електрофореза. Радиообележувањето на лиофилизираните формулации со имуноконјугати беше извршено со 555 GBq/mg од Lu-177, при што сите три радиообележани продукти покажаа висок степен на радиохемиска чистота на профилите на ITLC и SE-HPLC.

Воведена беше постапка на синтеза на цврста фаза на модифицирана супстанца „P“, [Cys⁻¹,Cys⁰]-SP, погодна за радиообележување нитридо метал јон [^{99m}Tc/¹⁸⁸Re≡N]²⁺. Применетиот пристап на радиообележување овозможи добивање на радиокоњугати со радиохемиска чистота над 95 %. Карактеризацијата на радиокоњугатот *in vitro* покажа задоволителна стабилност но, комплексите на [Cys⁻¹,Cys⁰]-SP со Tc-99m покажаа опаѓање на стабилноста во серум, а најголемо опаѓање на стабилноста беше забележано во серум на стаорец, под 80 % за 30 min. Биодистрибуционите студии кај глушец *ex vivo*, покажаа зголемена активност во тимусот, 0,0132 % IA/g, после 60 min од инјектирањето и 0,00938 % IA/g после 180 min од инјектирањето. Исто така, позначајно зголемување на активноста беше забележано во регионот на плунковните жлезди, црниот дроб и интестиналната регија, додека после 60 min од апликацијата, се забележува доминантната елиминација преку бубрезите.

Применетите пристапи на радиообележување на моноклонални антителиа и пептиди, поставија основа за понатамошни претклинички/клинички истражувања дијагностика/терапија на лимфоми, односно дијагностика/терапија на глиобластоми.

Клучни зборови: ритуксимаб, лиофилизација, супстанца „P“, Lu-177, Tc-99m, Re-188.

Katarina Smilkov

**DEVELOPMENT AND STANDARDIZATION OF NEW METHODS OF
FORMULATION OF THERAPEUTIC RADIOPHARMACEUTICALS, BASED ON
MONOCLONAL ANTIBODIES AND PEPTIDES - DOTA-RITUXIMAB AND
SUBSTANCE P**

Abstract

The aim of this doctoral thesis is to contribute to the development of new radiopharmaceutical formulations, by introducing a new modality of radiolabeled chimeric antibody, anti-CD20 (rituximab) with Lu-177. An accent was given to selection of bifunctional chelating agent for antibody conjugation and formulation of a lyophilizate, suitable for immediate labeling, therefore contributing to the choice of therapeutical modalities for treatment of patients with lymphoma (specifically, Non-Hodgkin's lymphoma). A synthesis procedure and formulation of a peptide-based product (modified substance P) was implemented, and also characterization and radiolabeling with Tc-99m и Re-188, in addition to the general approach of peptide/protein radiolabeling with radioisotopes emitting of gamma (beta/gamma) energy, for diagnostic/therapeutic purposes.

For this purpose, first, a selection of the most suitable molar ratio for conjugation of rituximab with three types of bifunctional chelating agents, *p*-Bn-SCN-DOTA, *p*-Bn-SCN-DTPA и 1B4M-DTPA, 1:20, has been made. Also, a lyophilization protocol which enables preservation of the properties of the immunoconjugates has been selected and implemented, which was confirmed using SDS-PAGE electrophoresis. The radiolabeling of the lyophilized immunoconjugate formulations was performed using activity of 555 GBq/mg of Lu-177. All three types radioimmunoconjugates showed high radiochemical purity during ITLC and SE-HPLC profiling.

In addition, a solid phase synthesis procedure of modified substance P, [Cys⁻¹,Cys⁰]-SP was established, therefore enabling radiolabeling of nitrido-radiometal ion [^{99m}Tc/¹⁸⁸Re≡N]²⁺. The radiolabeling approach enabled obtaining of radioimmunoconjugates with over 95 % radiochemical purity. The *in vitro* characterization of the immunoconjugates showed satisfactory stability, but Tc-99m complexes of [Cys⁻¹,Cys⁰]-SP showed decrease of stability in rat serum below 80 % after 30 min. The biodistribution studies in mice *ex vivo*, showed increased activity in the thymus, 0.0132 % IA/g, 60 min after injection, and 0.00938 % IA/g 180 min after injection. Also, a significant uptake in the salivary glands, the liver and intestinal region was registered, while 60 min after application predominant kidney elimination was present.

The implemented monoclonal antibodies and peptide radiolabeling approaches form a base for further preclinical/clinical research for lymphoma/glyoblastoma diagnosis/therapy.

Key words: rituximab, lyophilization, substance P, Lu-177, Tc-99m, Re-188.