

## رادیوایمونوکنژوگه $^{67}\text{Ga-CHX-A}''\text{-DTPA-(anti-EGFR)}$ به عنوان یک عامل بالقوه برای

### رادیوایمونوسیتتی گرافی: تولید، کنترل کیفی و ارزیابی پیش‌بالینی

بهروز علیرضاپور<sup>۱\*</sup> و محمد علیزاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> شرکت پارس ایزوتوپ، تهران، ایران.

\*ایران، تهران، سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها، کد پستی: ۰۱۲۳۴-۵۶۷۸۹.

پست الکترونیکی: balirezapour@aeoi.org.ir

#### چکیده

رادیوایمونوسیتتیگرافی سرطان کولورکتال، باهدف قراردادادن پروتئین EGFR (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی) یک زمینه رو به رشد در تحقیقات پزشکی هسته‌ای است. در این مطالعه، آنتی‌بادی مونوکلونال ستوکسیمب با تمایل اتصال بالا به پروتئین هدف، پس از کانژوگاسیون با شلاتور CHX-A''-DTPA در سه نسبت مولار مختلف از شلاتور به آنتی‌بادی (۵۰، ۸۰ و ۱۲۰)، در نهایت انتخاب نسبت ۱:۵۰ با میانگین تعداد شلاتورهای متصل شده به هر مولکول آنتی‌بادی معادل  $0.49 \pm 1/4$  با درصد بالایی از خلوص رادیو شیمیایی (بیشتر از ۹۸٪) با  $^{67}\text{Ga}(\text{GaCl}_3)$  نشان‌دار گردید. پایداری برون تنی در بافر فسفات و سرم انسانی تا ۴۸ ساعت پس از تهیه به ترتیب بیشتر از ۹۷٪ و ۹۱٪ به دست آمد. تمایل اتصال بالای ستوکسیمب نشان‌دار شده به پروتئین هدف با تعیین رادیوایمونوراکتیویته و نیز داخلی‌سازی آن با استفاده از سلول‌های سرطانی کولورکتال رده SW۴۸۰ و سلول‌های تخمدان همستر چینی رده CHO (کنترل منفی) به دست آمد که نتایج رادیوایمونوراکتیویته معادل ۸۳٪ نشان‌دهنده تمایل اتصال بالای رادیوایمونوکنژوگه موردنظر به گیرنده هدف در سطح سلول مورد مطالعه است. رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A}''\text{-DTPA-(anti-EGFR)}$  یک ترکیب بالقوه برای تصویربرداری مولکولی SPECT جهت تشخیص و نیز زمینه‌ساز در سایر مطالعات درمانی در انکولوژی است.

کلیدواژگان: رادیوایمونوکنژوگه، گالیم-۶۷، ستوکسیمب، EGFR، سرطان کولورکتال، رادیوایمونوسیتتی گراف.

#### ۱. مقدمه

تشخیص سریع و زودرس و به طبع آن اتخاذ روش درمان مناسب آن است [۲،۱]. در بین روش‌های تشخیصی و درمانی نوین برای انواع سرطان می‌توان به ایمونوتراپی<sup>۱</sup> و رادیوایمونوتراپی<sup>۲</sup> اشاره کرد که به طور هدفمند سلول‌های سرطانی مورد شناسایی

سرطان در حال حاضر در سراسر جهان دومین عامل مرگ‌ومیر بعد از بیماری‌های قلبی عروقی در میان عوامل پزشکی که منجر به مرگ می‌شوند، به حساب می‌آید که شیوع آن همچنان در حال گسترش است. کلید درمان موفق این دسته از بیماری‌ها در

<sup>2</sup> Radio immunotherapy

<sup>1</sup> Immunotherapy

درمان سرطان بر گیرنده‌های واقع در سطح سلول‌های سرطانی تمرکز دارند که در سلول‌های سرطانی بیشتر از بافت طبیعی بیان می‌شوند [۸].

طی سال‌های متمادی گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی<sup>۶</sup> (EGFR) به‌عنوان یک هدف اصلی برای درمان رشد غیر قابل کنترل تومور مورد بررسی قرار گرفته است. EGFR یک پروتئین غشایی گلیکوزیله که یکی از چهار عضو گیرنده تیروزین کینازها که در تنظیم رشد سلولی، تمایز و بقای سلول‌ها نقش دارد. EGFR اغلب در بدخیمی‌های انسانی از قبیل سرطان سر و گردن<sup>۷</sup> (HNSCC)، سرطان دستگاه گوارش و شکم، سرطان ریه، کارسینومای دستگاه تناسلی، ملانوم، گلیوبلاستوما و سرطان تیروئید بیش از حد بیان می‌شود. برای هدف قرار دادن تکثیر یا رشد سلول‌های توموری از طریق EGFR، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه این گیرنده ایجاد شده است. ستوکسیمب آنتی‌بادی مونوکلونال کایمیریک انسانی موشی IgG ۱ که یک داروی بالقوه امیدوارکننده است که توسط سازمان غذا و دارو در سال ۲۰۰۴ برای درمان سرطان کلورکتال (روده بزرگ) به‌عنوان داروی منفرد یا در ترکیب با شیمی درمانی مورد تأیید قرار گرفته است. ستوکسیمب با وزن مولکولی ۱۵۲ کیلو دالتون از دو زنجیره سنگین با ۴۴۹ اسید آمینه و دو زنجیره سبک با ۲۱۴ اسید آمینه تشکیل شده است [۳].

در این بین به‌منظور دستیابی به تشخیص و درمان مناسب مبتنی بر آنتی‌بادی‌ها، انتخاب یک رادیو نوکلید که دارای ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مناسب با توجه به هدف کاربرد آن (تشخیص، درمان یا تشخیصی-درمانی) حائز اهمیت است [۱۰].

و حمله قرار می‌گیرند. ایمونوتراپی که خود شامل گروه وسیع و سریع در درمان است که دارای اثرات اساسی و مفید در نتایج سرطان است. در این گروه از روش برای مقابله با سرطان می‌توان به فعال کردن سیستم ایمنی به‌طور خاص و ویژه در سلول‌های سرطانی بدون عوارض جانبی گسترده که در شیمی درمانی‌های مرسوم و قدیمی وجود داشت، اشاره کرد [۳]. از مولکول‌های مورد استفاده در درمان‌های هدفمند سرطان می‌توان به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، قطعات جدا شده از آنتی‌بادی‌ها و پپتیدها اشاره کرد که امروزه از این بیومولکول‌ها جهت استفاده در بدخیمی‌های خونی<sup>۱</sup> (ریتوکسیمب<sup>۲</sup>)، سرطان پستان (تراستوزومب<sup>۳</sup>)، سرطان سر و گردن و کلورکتال (ستوکسیمب<sup>۴</sup>) و ... به‌صورت تجاری قابل عرضه است که این خود نوید بخش برای این قبیل از درمان‌ها در سرطان‌ها است [۴-۷]. در روش دیگر یعنی رادیوایمونوتراپی علاوه بر استفاده از بیومولکول‌های مذکور از ترکیبات رادیواکتیو نیز جهت استفاده در تشخیص و درمان مورد بهره برداری قرار گیرد. همچنین در این روش، بنا بر خواص رادیونوکلید مورد استفاده، می‌توان در پایش درمان و نیز در مطالعات دزیمتری بهره جست. رادیو ایمونوتراپی مزایای متفاوتی را نسبت به استفاده از آنتی‌بادی‌های غیرنشان‌دار در ایمونوتراپی در درمان گونه‌های مختلف سرطان ارائه می‌دهد [۸]. رادیوایمونوتراپی مکانیسم‌های رادیولیتیک و بیولوژیکی به منظور تخریب سلول‌های توموری را ترکیب می‌کند. اشعه بتا ساطع شده از رادیونوکلید با اثر آتش متقاطع<sup>۵</sup> این امکان را فراهم می‌کند که سلول‌های سرطانی که پروتئین هدف را بیان نکرده‌اند نیز مورد حمله و آسیب قرار گیرند و از پرتوی گامای ساطع شده برای پایش درمان و نیز دزیمتری به‌طور همزمان می‌توان بهره جست [۹]. در حال حاضر رویکردهای هدفمند موفق برای

<sup>۵</sup> cross fire effect

<sup>۶</sup> Epidermal Growth Factor Receptor

<sup>۷</sup> Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

<sup>۱</sup> Hematologic

<sup>۲</sup> Rituximab

<sup>۳</sup> Trastuzumab

<sup>۴</sup> Cetuximab

خلوص بالا همراه با تحلیل گر چند کاناله کانبرا (model GC1۰۲۰-۷۵۰۰SL) استفاده شد.

## ۲.۲. کنژوگه کردن آنتی بادی مونوکلونال ستوکسیمب با

### شلاتور $\text{CHX-A}''\text{-DTPA}$

انجام کنژوگاسیون در این پژوهش در سه نسبت مولی ۱:۵۰، ۱:۸۰ و ۱:۱۲۰ از آنتی بادی به شلاتور انجام پذیرفت. برای دستیابی به ایمنوکنژوگه مناسب برای نشان داری و ایجاد کمپلکس پایدار رادیوایمونوکنژوگه و برای بررسی عملکرد آن در مطالعه برون تنی و نیز درون تنی، ایجاد ارتباط قوی بین آنتی بادی و شلاتور امری ضروری است (شکل ۱). این ارتباط که از طریق اتصال کووالانسی توسط پیوندهای آمیدی بین عوامل آمینی موجود در آنتی بادی و عوامل کربوکسیلیک موجود در شلاتور ایجاد می شود که تحقق این امر نیازمند انتخاب بافر مناسب و نیز دما و زمان بهینه برای انجام واکنش کنژوگاسیون است. به ترتیب نسبت های مولی مذکور مقدار ۲/۲، ۳/۶ و ۵/۵ میلی گرم از شلاتور  $\text{CHX-A}''\text{-DTPA}$  را با مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر بی کربنات سدیم با pH: ۹/۲ در ویال شیشه ای استریل حل می کنیم. سپس محتویات این ویال را به ویال حاوی ۱۰ میلی گرم از آنتی بادی ستوکسیمب که از قبل خالص سازی شده است را اضافه کرده و ۲۰ تا ۳۰ مرتبه به آرامی پیتاژ می کنیم. ویال محتوی مخلوط آنتی بادی و شلاتور را به مدت ۱۲ تا ۱۵ ساعت جهت انجام واکنش کنژوگاسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم. پس از اتمام مدت زمان مذکور، محتویات ویال را برای انجام تغییر بافر و نیز به منظور جداسازی شلاتورهای متصل نشده به فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتون منتقل می کنیم. تغییر بافر از pH: ۹/۲ در مرحله کنژوگاسیون (بافر بی کربنات سدیم) به pH: ۵/۲ در بافر نشان داری (آمونیم

گالیم-۶۷<sup>۱</sup> رادیونوکلید ساطع کننده پرتو گاما با نیمه عمر فیزیکی ۳/۲۶ روز است که دارای انرژی با مقادیر ۹۳.۳ keV (۳۹/۲٪)، ۱۸۴ keV (۲۱/۲٪) و ۳۰۰ keV (۱۶/۸٪) است. شیمی پایدار این رادیوایزوتوپ فلزی و نیمه عمر فیزیکی مناسب آن جهت مطالعات تشخیصی و دزیمتری و نیز سهولت در تولید سبب گردیده تا در طی سال های گذشته تحقیقات متعددی در زمینه تصویربرداری اسپکت<sup>۲</sup> (SPECT) با این رادیو نوکلید انجام پذیرد [۱۱،۹]. اتصال پایداری که این رادیونوکلید با عوامل شلاته کننده مشتق از شلاتورهای DOTA و DTPA ایجاد می کند یکی از عوامل انتخاب آن در پژوهش حاضر است [۱۷-۱۲].

## ۲. روش کار

### ۱.۲. مواد و تجهیزات

در این پژوهش رادیونوکلید  $^{67}\text{GaCl}_3$  با خلوص رادیو نوکلیدی ۹۹٪ با اکتیویته ۵۰ میلی کوری در گروه پژوهشی پزشکی هسته ای سازمان انرژی اتمی مرکز کرج با سیکلوترون<sup>۳</sup> ۳۰ MeV ساخت کشور بلژیک تولید شده است. آنتی بادی مونوکلونال ستوکسیمب از شرکت مرک<sup>۴</sup> خریداری شده است و به عنوان یک آنتی بادی بر علیه گیرنده EGFR عمل می کند. شلاتور  $\text{CHX-A}''\text{-DTPA}$  از شرکت ماکروسیکلیک<sup>۵</sup> آمریکا تهیه شده است. تمامی مواد شیمیایی و حلال ها نیز از شرکت سیگما تهیه شده است. رده های سلولی SW۴۸۰ و CHO از انستیتو پاستور ایران خریداری شده است. جهت انجام کنترل کیفی به منظور تعیین درصد خلوص رادیوشیمیایی ترکیبات نشان دار شده اسکن کاغذهای کروماتوگرافی از دستگاه ۲۰۰۰ Bioscan-AR ساخت کشور فرانسه استفاده گردید. همچنین برای طیف سنجی پرتو گاما از آشکارساز  $\text{HPGe}$ <sup>۶</sup> با درجه

<sup>۴</sup> Merck

<sup>۵</sup> Microcyclic

<sup>۶</sup> High Purity Germanium

<sup>۱</sup> Gallium-67

<sup>۲</sup> Single Photon Emission computed Tomography

<sup>۳</sup> Cyclotron

این ترتیب جذب حاصل از کمپلکس در محلول کاهش می‌یابد که میزان کاهش با مقدار شلاتور افزوده شده، ارتباط دارد. نشان‌گر این است که جذب نوری کمپلکس ایتريوم آرسنازو III با فرمول  $Y(AAIII)_2$  با افزایش چهار غلظت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرومولاری از شلاتور p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA به کمپلکس در طول موج ۶۵۲ نانومتر کاهش می‌یابد. این کاهش نشان‌گر جایگزین شدن آرسنازو با شلاتور مذکور است.

### ۳.۲. نشان‌دارسازی ایمونوکژوگه CHX-A"-DTPA- Cetuximab با گالیم ۶۷

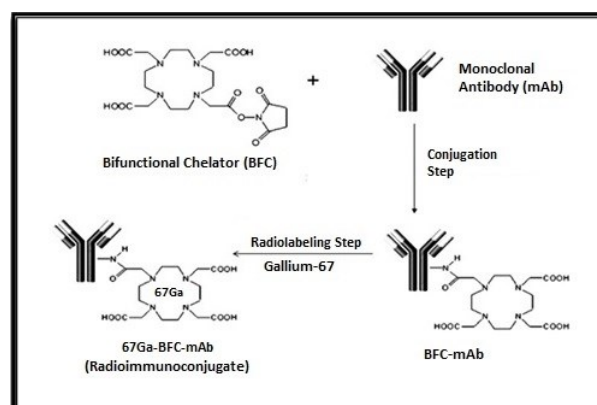
ویال حاوی گالیم ۶۷ کلراید (۳۰ میلی‌کوری) جهت خشک کردن و خارج نمودن کلریدریک اسید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و نیز تحت جریان ملایم گاز نیتروژن قرار گرفت. سپس به ویال حاوی اکتیویته، مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از بافر آمونیوم استات (pH: ۵/۵) اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با پیپتاژ کردن دیواره‌های ویال مورد شستشو قرار گرفت تا اکتیویته در بافر نشان‌دارسازی حل گردد. پس از کوریتری مقدار ۶ میلی‌کوری از محلول حاوی اکتیویته با حجم ۱۰۰ میکرولیتر درون ویال شیشه‌ای ریخته شد و به آن مقدار ۴۰۰ میکرولیتر از بافر آمونیوم استات اضافه گردید. پس از ۲۰ بار پیپتاژ کردن محتویات ویال حاوی اکتیویته به آن مقدار ۱ میلی‌گرم از ایمونوکژوگه CHX-A"-DTPA-Cetuximab با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و جهت انجام واکنش نشان‌دارسازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

### ۴.۲. کنترل کیفی رادیوایمونوکژوگه Ga-CHX-A"-DTPA-

#### $^{67}\text{Ga}$ Cetuximab به منظور ارزیابی خلوص رادیوشیمیایی<sup>۲</sup>

انجام بررسی‌های کنترل کیفی فرآورده سنتز شده جهت تعیین درصد خلوص رادیوشیمیایی در زمان‌های مختلف پس از شروع واکنش نشان‌دارسازی و نیز انجام مطالعات پایداری در سرم و

استات) موجب توقف واکنش کانژوگاسیون می‌شود و پس از اتمام مراحل خالص سازی با اولترافیلتراسیون (هر مرحله از تخلیص ۲ تا ۳ مرتبه به مدت ۳۰ دقیقه با سانتریفیوژ در ۴۵۰۰ rpm<sup>۱</sup> انجام پذیرفت) ایمونوکژوگه CHX-A"-DTPA- Cetuximab در بافر آمونیوم استات با pH: ۵/۲ جمع آوری و برای انجام نشان‌دارسازی با استفاده از معرف برد فورد تعیین غلظت گردید.



شکل (۱): طرح شماتیک از مرحله کانژوگاسیون و رادیونشان‌دارسازی مولکول مونوکلونال آنتی‌بادی.

### ۱.۲.۲. تخمین تعداد میانگین شلاتور متصل شده به هر مولکول آنتی‌بادی

میانگین تعداد شلاتور متصل شده به هر مولکول آنتی‌بادی با استفاده از روش Pipin به شرح زیر محاسبه گردید [۱۸]. برای تهیه کمپلکس ایتريوم آرسنازو به فرمول  $Y(AAIII)_2$  از مواد زیر استفاده گردید: آرسنازو ۵ میکرومولار، ایتريوم ۱/۶ میکرومولار و بافر استات سدیم ۰/۱۵ مولار در ۴۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل شدند و پس از تنظیم pH: ۴ حجم به ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و در ظرفی در محیط تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. ماکزیمم جذب محلول فوق در ۶۵۲ نانومتر است. با افزودن شلاتور p-SCN-Bn-CHX-A"-DTPA با غلظت‌های مختلف به کمپلکس آرسنازو-ایتريوم، ایتريوم از آرسنازو جدا شده و درون شلاتور اضافه شده جای می‌گیرد. به

<sup>2</sup> Radio Chemical Purity

<sup>1</sup> Revolution per minute

۶.۲. بررسی پایداری ایمونوکنژوگه نشان‌دار شده در بافر فسفات سالین<sup>۴</sup>

به منظور تعیین پایداری ایمونوکنژوگه نشان‌دار شده با گالیم ۶۷ در بافر فسفات در دمای ۴ درجه سانتیگراد (درجه حرارت مورد نیاز برای حمل و نگهداری رادیو دارو)، مقدار ۳۰۰ میکروکوری از فرآورده نشان‌دار شده به ویال حاوی بافر فسفات اضافه گردید. جهت تعیین درصد پایداری نمونه‌های نشان‌دار شده در زمان‌های مختلف (۱، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) پس از نشان‌دارسازی نمونه‌هایی تهیه شده و به روش رادیوکروماتوگرافی RTLC که در بالا شرح داده شد میزان اکتیویته آزاد و اکتیویته متصل شده به ایمونوکنژوگه به دست آمد. هر اندازه‌گیری به منظور بالا بردن دقت محاسبات ۳ مرتبه تکرار و در نهایت میانگین‌گیری شد.

۷.۲. بررسی پایداری ایمونوکنژوگه نشان‌دار شده در سرم خون انسانی

به این منظور، همانند مرحله قبل مقدار ۳۰۰ میکروکوری از فرآورده نشان‌دار شده را به ۱ میلی‌لیتر از سرم تازه انسانی تهیه شده اضافه شد و با تکان ملایم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بدن) تحت انکوباسیون قرار گرفت. در زمان‌های مختلف (۱، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) میزان پایداری رادیوایمونوکنژوگه تهیه شده توسط RTLC تعیین و محاسبه گردید. هر اندازه‌گیری به منظور بالا بردن دقت محاسبات ۳ مرتبه تکرار و در نهایت میانگین‌گیری شد.

۸.۲. اندازه‌گیری واکنش‌پذیری<sup>۵</sup> رادیوایمونوکنژوگه  $\text{Ga-CHX-A}^{\text{anti-EGFR}}\text{-DTPA-Cetuximab}$  با رده سلولی SW۴۸۰

بررسی واکنش‌پذیری ایمنی آنتی‌بادی مونوکلونال ستوکسیمب نشان‌دار شده، در رده سلولی SW۴۸۰ با استفاده از روش

بافر فسفات سالین در زمان‌های مختلف از روش ساده و تکرار پذیر رادیوکروماتوگرافی لایه نازک<sup>۱</sup> (RTLC) با استفاده از کاغذ واتمن و فاز متحرک  $\text{DTPA}^2$  (۱ میلی‌مولار با pH: ۴/۵) انجام شد. جهت تعیین درصد خلوص رادیوشیمیایی و نیز بررسی تأثیر زمان بر بازده نشان‌دارسازی، در زمان‌های مختلف ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از شروع واکنش نشان‌دارسازی در دمای ۳۷ درجه، از ویال حاوی واکنش مقدار ۰/۵ میکرولیتر نمونه گرفته شد و بر روی نقطه مورد نظر در کاغذ واتمن شماره ۲ لکه گذاری شد که هر اندازه‌گیری ۲ مرتبه تکرار شد. (کاغذ در ابعاد ۱۴×۱ بریده شده و در ۱ سانتی‌متری بخش پایین کاغذ لکه گذاری شد) پس از خشک شدن نمونه‌های لکه گذاری شده، کاغذها در تانک حاوی فاز متحرک DTPA قرار داده شدند. پس از مهاجرت کامل فاز متحرک روی کاغذها (۱۰ سانتی‌متر)، کاغذها از طرف خارج و خشک گردیدند و با دستگاه اسکنر RTLC مورد اسکن و خوانش قرار گرفتند.

۵.۲. تعیین حفظ یکپارچگی یا تعیین یکنواختی ساختار

آنتی‌بادی در نمونه‌های نشان‌دار شده با گالیم ۶۷

تعیین و بررسی یکپارچگی ساختار آنتی‌بادی در نمونه‌های نشان‌دار شده و ایمونوکنژوگه غیر نشان‌دار در مقایسه با آنتی‌بادی بدون تغییر با استفاده از الکتروفورز پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات توسط الکتروفورز مینی ژل تعیین گردید. مقدار ۱۵ میکروگرم از هر نمونه با حجم ۱۰ میکرولیتر (Cetuximab، CHX-A-DTPA-Cetuximab و  $^{67}\text{Ga-CHX-A}^{\text{anti-EGFR}}\text{-DTPA-Cetuximab}$ ) در هر چاهک موجود در ژل تهیه شده بارگذاری که این مرحله از مطالعه طبق روش لاملی<sup>۳</sup> صورت پذیرفت.

<sup>4</sup> Phosphate Buffer Saline

<sup>5</sup> Immunoreactivity

<sup>1</sup> Radio Thin Layer Chromatography

<sup>2</sup> Diethylene Triamine Pentaacetic Acid

<sup>3</sup> Laemmli

لیندمو<sup>۱</sup> به شرح ذیل انجام پذیرفت [۱۹]. همچنین لازم به ذکر است که از رده سلولی CHO به عنوان کنترل منفی استفاده گردید زیرا این رده سلولی پروتئین EGFR را بیان نمی‌کند.

از استوک سلول SW۴۸۰،  $1 \times 10^7$  cell/ml، رقت‌های متوالی با غلظت‌های  $5 \times 10^6$ ،  $2.5 \times 10^6$ ،  $1.2 \times 10^6$ ،  $6 \times 10^5$  و  $3 \times 10^5$  و  $1.5 \times 10^5$  سلول تهیه شد و حجم آن با PBS به  $0.5$  میلی‌لیتر رسانده شد. از استوک سلولی CHO (به‌عنوان کنترل منفی) نیز همانند رده SW۴۸۰ رقت‌های متوالی تهیه گردید. به هر یک از لوله‌های حاوی رده‌های سلولی مقدار  $0.5$  میلی‌لیتر از رادیوایمونوکنتز وگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A-DTPA-Cetuximab}$  با غلظت  $40 \text{ ng/ml}$  (حدود  $1000 \text{ cps}^2$  برای هر لوله) اضافه گردید و لوله‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با رادیوایمونوکنتز وگه به مدت یک شب تحت انکوباسیون در دمای  $4$  درجه سانتی‌گراد (یا  $4$  ساعت در دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. پس از گذشت زمان انکوباسیون سلول‌ها در  $2000 \text{ rpm}$  برای زمان  $6$  دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع‌رویی جمع‌آوری و دور ریخته شد. میزان رادیوایمونوکنتز سلول‌ها در دو مرحله قبل و بعد از سانتریفیوژ توسط گاما کانتر چاهکی شمارش گردید. در نهایت با استفاده از معادله لینوربرک و با رسم منحنی اکتیویته کل به اکتیویته متصل شده در مقابل عکس غلظت سلول‌ها، درصد ایمونوراکتیویته آنتی‌بادی نشان‌دار شده به‌دست می‌آید.

## ۹.۲. بررسی ایترنالیزاسیو<sup>۳</sup> رادیوایمونوکنتز وگه $^{67}\text{Ga-CHX-A-DTPA-Cetuximab}$ بر روی رده سلولی SW۴۸۰ و CHO

سلول‌های SW۴۸۰ و CHO (کنترل منفی) به تعداد  $1 \times 10^5$  سلول در  $400$  میکرولیتر از محیط کشت کامل در هر چاهک از پلیت‌های  $12$  خانه کشت داده شدند و برای مدت  $24$  ساعت

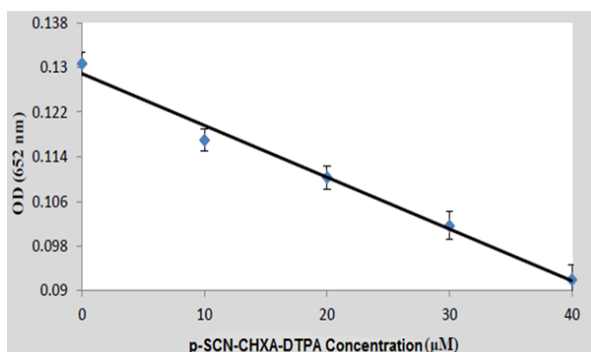
در انکوباتور  $\text{Co}_2$  در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفتند به طوری که کف چاهک‌ها پوشیده از سلول شوند. پس از گذشت این زمان مقدار  $40$  نانوگرم از رادیوایمونوکنتز وگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A-DTPA-Cetuximab}$  با اکتیویته  $1000 \text{ cps}$  با حجم  $0.5$  میلی‌لیتر به هر چاهک از پلیت‌های  $12$  خانه حاوی سلول‌های SW۴۸۰ و CHO افزوده شد و به مدت  $2$  ساعت در انکوباتور  $\text{Co}_2$  قرار داده شد. پس از گذشت این زمان سلول‌ها  $5$  مرتبه با PBS استریل شستشو شدند و سپس به هر چاهک مقدار  $400$  میکرولیتر محیط کشت کامل افزوده شد و در شرایط رشد سلول انکوبه شدند. در زمان‌های مختلف ( $4$ ،  $8$ ،  $12$ ،  $16$ ،  $20$ ،  $24$ ،  $28$ ،  $32$ ،  $36$  و  $48$  ساعت) پس از تیمار سلول‌ها با رادیوایمونوکنتز وگه، محیط رویی از چاهک‌ها خارج شده و به نیمی از چاهک‌ها محلول اسید استیک  $0.1$  مولار با  $\text{pH}: 4$  و به نیمی دیگر از چاهک‌ها محلول NaOH  $0.1$  مولار افزوده شد و به مدت  $15$  دقیقه در دمای  $37$  درجه قرار داده شدند. محتویات درون چاهک‌ها به‌طور جداگانه در میکروتیوب‌ها ریخته شدند و رادیوایمونوکنتز وگه محتویات سوپرناتانت با استفاده از شمارش‌گر گامای چاهکی اندازه‌گیری شد. محلول NaOH باعث تخریب کل سلول‌ها شده و این محلول به‌عنوان کل فعالیت رادیوایمونوکنتز وگه (رادیوایمونوکنتز وگه داخل شده به سلول، متصل شده به سلول و نیز جدا شده از سلول) در نظر گرفته می‌شود و محلول اسید استیک باعث از بین بردن اتصال بین رادیوایمونوکنتز وگه با EGFR در سطح سلول می‌شود و به‌عنوان رادیوایمونوکنتز وگه متصل شده به سطح سلول و جدا شده از سلول در نظر گرفته می‌شوند که تفاوت این دو مقدار، داروی ایترنالیزه شده را منعکس می‌کند [۲۰].

<sup>3</sup> Internalization

<sup>1</sup> Lindmo

<sup>2</sup> Count Per Second

ذکر است در تمام مراحل انجام آزمایشات از نسبت ۱:۵۰ استفاده شده است.



شکل (۲): منحنی کاهش جذب کمپلکس آرسنازو-ایتريوم در مقابل شلاتور  $\text{p-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA}$  در چهار غلظت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرومولاری از شلاتور به کمپلکس در طول موج ۶۵۲ نانومتر (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).

جدول (۱): میانگین تعداد شلاتور متصل شده به هر مولکول آنتی بادی مونوکلونال در سه نسبت مولار مختلف از شلاتور (۵۰، ۸۰ و ۱۲۰) اضافه شده در واکنش کنژوگاسیون (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).

Bifunctional chelator	Immunoconjugate	Molar excess of chelator added to conjugation reaction	Average number of Chelators/mAb
p-SCN-Bn-CHX-A''-DTPA	CHX-A''-DTPA-Cetuximab	۵۰	$4/1 \pm 0/49$
		۸۰	$6/9 \pm 0/34$
		۱۲۰	$9/9 \pm 0/7$

۲.۳. نتایج حاصل از کنترل کیفی نشان دارسازی ایمونوکنژوگه  $\text{CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  با گالیم-۶۷ با تعیین خلوص رادیوشیمیایی

ایمونوکنژوگه تهیه شده با نسبت ۱:۵۰ از آنتی بادی به شلاتور، تحت شرایط بهینه شده (دمای ۳۷ درجه و زمان ۶۰ دقیقه) با گالیوم-۶۷ کلراید تحت واکنش نشان دارسازی قرار گرفت که پس از اتمام واکنش خلوص رادیوشیمیایی با استفاده از

۲.۱۰. بررسی توزیع زیستی رادیوایمونوکنژوگه

$^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  در رت های سالم

به منظور بررسی توزیع زیستی رادیوداروی تولید شده در اندام های مختلف، مطالعه توزیع زیستی در رت های سالم در بازه های زمانی ۳، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تزریق انجام شد. به این ترتیب که پس از تولید رادیوداروی  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  و انجام مراحل کنترل کیفی جهت تعیین خلوص رادیوشیمیایی، به هر رت مقدار ۴۰ میکروگرم با اکتیویته ۲۰۰ میکروکوری از رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  و گالیم-۶۷ آزاد با ۲۰۰ میکروکوری به صورت داخل وریدی و جداگانه تزریق شدند. رت ها در زمان های مذکور پس از تزریق توسط مخزن  $\text{Co}^{60}$  قربانی شدند و بافت های حیاتی مختلف از نظر توزیع رادیو دارو با استفاده از آشکارساز ژرمانیم با خلوص بالا برحسب درصد دوز تزریق شده در هر گرم بافت تعیین گردید. همچنین تصویر برداری از رت های نر سالم به روش رادیوایمونوسیتی گرافی از کل بدن رت ها در زمان های مورد مطالعه با استفاده از دوربین Dual head SPECT واقع در گروه پژوهشی پزشکی هسته ای، پژوهشکده تحقیقات پزشکی، کشاورزی و صنعتی کرج وابسته به سازمان انرژی اتمی ایران صورت پذیرفت.

### ۳. نتایج

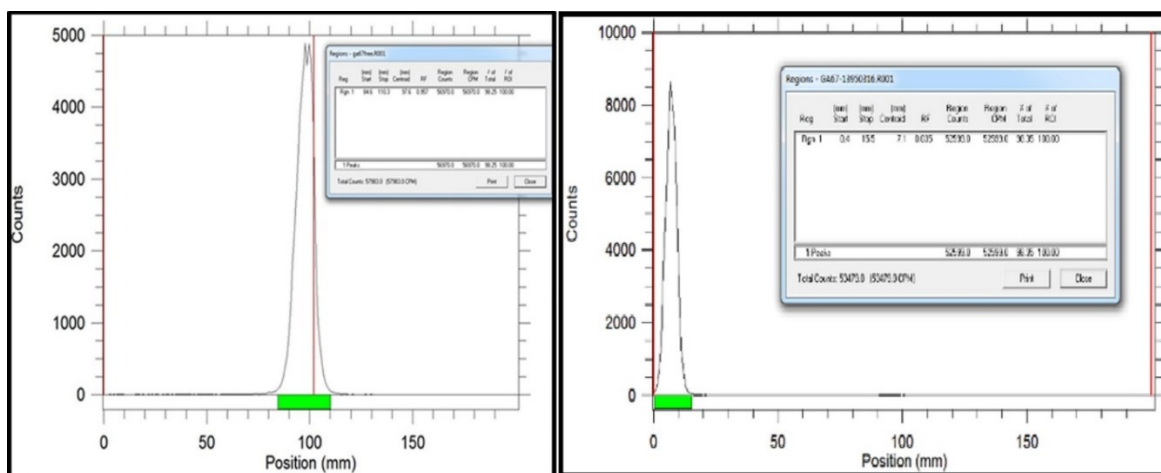
۱.۳. نتایج حاصل از کنژوگاسیون شلاتور  $\text{CHX-A''-DTPA}$

با آنتی بادی مونوکلونال ستوکسیمب

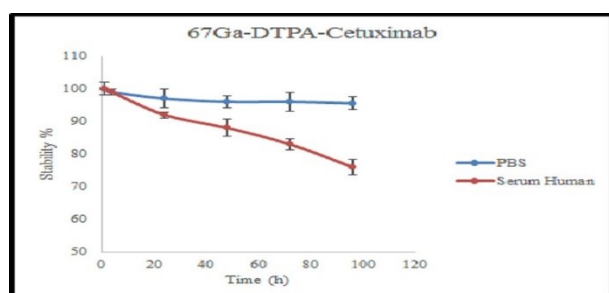
واکنش کنژوگاسیون شلاتور با آنتی بادی بر اساس روش pipin (شکل ۲) در سه نسبت مولار مختلف از شلاتور به آنتی بادی (۵۰، ۸۰ و ۱۲۰) انجام پذیرفت که تخمین میانگین تعداد شلاتورهای متصل شده به هر مولکول آنتی بادی به ترتیب  $0/49$ ،  $6/9 \pm 0/34$ ،  $9/9 \pm 0/7$  به دست آمد (جدول ۱). شایان

مناسب و بهینه در مرحله نشان‌دارسازی حائز اهمیت است؛ زیرا در دماهای بالا به ساختار مولکول آنتی‌بادی آسیب وارد شده و این امر منجر به کاهش کارایی در اتصال به پروتئین هدف می‌شود.

رادیوکروماتوگرافی لایه نازک بیشتر از ۹۸٪ به دست آمد (شکل ۳). در این شکل ایمونوکنزوگه نشان‌دار شده با گالیم-۶۷ در RF پایین (۰/۱) (ابتدای کروماتوگرام) و مقدار گالیم-۶۷ آزاد به منطقه با RF بالاتر (۰/۹) مهاجرت کرده است. انتخاب دمای



شکل (۳): کروماتوگرام RTLC از نمونه رادیوایمونوکنزوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  در کاغذ واتمن شماره ۲ با استفاده از محلول DTPA ۱ میلی مولار به عنوان فاز متحرک (pH: ۵/۵).



شکل (۴): آزمون پایداری رادیوایمونوکنزوگه در بافر فسفات و سرم خون انسانی در بازه‌های زمانی مختلف (۲، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت). نتایج درصد پایداری رادیوایمونوکنزوگه در این شکل بر اساس درصد خلوص رادیوشیمیایی بیان شده است (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).

۴.۳. نتایج حاصل از تعیین ایمونوراکتیویته رادیوایمونوکنزوگه  $^{67}\text{Ga-DTPA-Cetuximab}$  با پروتئین هدف

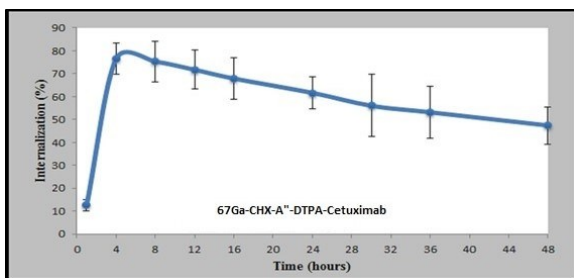
مطالعه تعیین واکنش‌پذیری زیستی اتصال ۸۳٪ از رادیوایمونوکنزوگه  $^{67}\text{Ga-DTPA-Cetuximab}$  به رده سلولی

۳.۳. نتایج حاصل از انجام مطالعات پایداری رادیوایمونوکنزوگه  $^{67}\text{Ga-DTPA-Cetuximab}$  در بافر فسفات و سرم خون انسانی

پایداری برون تنی در بافر فسفات و سرم انسانی تا ۲۴ ساعت پس از تهیه به ترتیب بیشتر از ۹۸٪ و ۹۳٪ و در شرایط مشابه ۴۸ ساعت پس از تهیه به ترتیب بیشتر از ۹۷٪ و ۹۱٪ به دست آمد (شکل ۴). نتایج حاصل از این مرحله بیان‌گر این است که رادیوایمونوکنزوگه تولید شده در دماها و محیط‌های مختلف از نظر شیمیایی دارای پایداری لازم است که این موضوع صحت انجام مراحل قبل را به منظور تولید رادیوایمونوکنزوگه پایدار در شرایط مناسب تصدیق می‌کند. نتایج گزارش شده در شکل ۴ که نشان‌دهنده پایداری این رادیوایمونوکنزوگه در دو محلول بافر فسفات و سرم خون انسانی است به صورت درصد خلوص رادیوشیمیایی ترکیب در زمان‌های مختلف (۲، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بیان شده است.

۶.۳. نتایج حاصل از بررسی توزیع زیستی  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  و گالیم-۶۷ آزاد

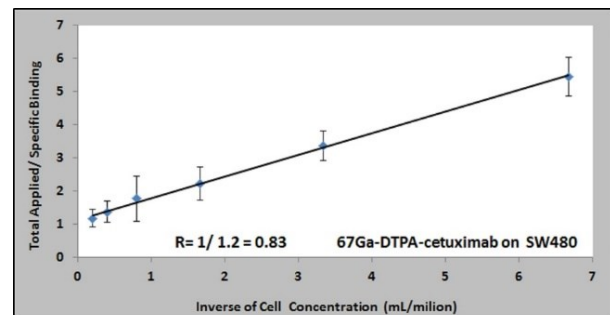
و تصویر برداری SPECT در موش‌های صحرایی سالم توزیع زیستی رادیوایمونوکنژوگه و گالیم-۶۷ آزاد در موش‌های سالم در طول فواصل زمانی ۳، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تزریق درون وریدی در شکل‌های ۷ و ۸، به صورت درصد دوز تزریق شده در هر گرم از بافت (%ID/g) به ترتیب نشان داده شده است (شکل ۷). تجمع آنتی‌بادی نشان‌دار شده در بافت‌های ریه، کبد، طحال و سایر بافت‌ها مشابه با الگوی توزیع سایر ایمونوکنژوگه‌های نشان‌دار شده در مطالعات انجام شده است. تصویر SPECT در شکل ۹ تجمع در اندام‌های درگیر در پاکسازی رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  را نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که افزایش تجمع در کبد و طحال به دلیل پاکسازی گالیم از منابع مختلف و یا جذب از طریق مجاری گوارشی و حمل آن توسط ترانسفرین و نهایتاً انباشت در بافت کبد و طحال باشد. نتایج به دست آمده مطابق با نتایج به دست آمده در سایر مطالعات انجام شده است [۲۱].



شکل (۶): درصد اینترنالیزاسیون رادیوایمونوکنژوگه

$^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  در مقابل رده سلولی SW480 در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان‌های مختلف (۲، ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت) نشان داده شده است (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).

SW480 را نشان داد (شکل ۵) که این نشان‌گر اختصاصیت اتصال آنتی‌بادی ستوکسیمب به پروتئین هدف EGFR است.

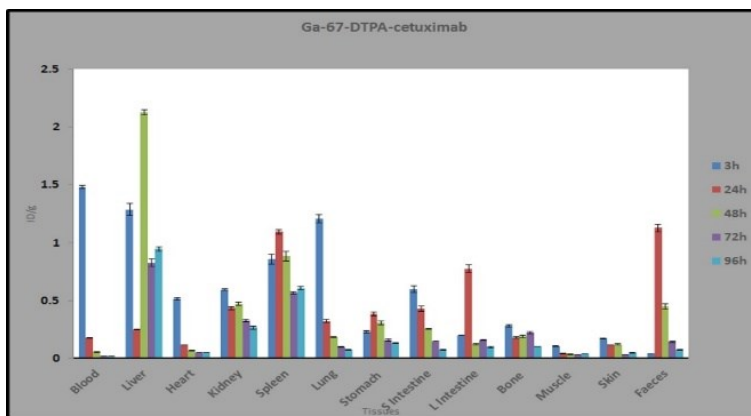


شکل (۵): واکنش پذیری زیستی (ایمونوراکتیویته)

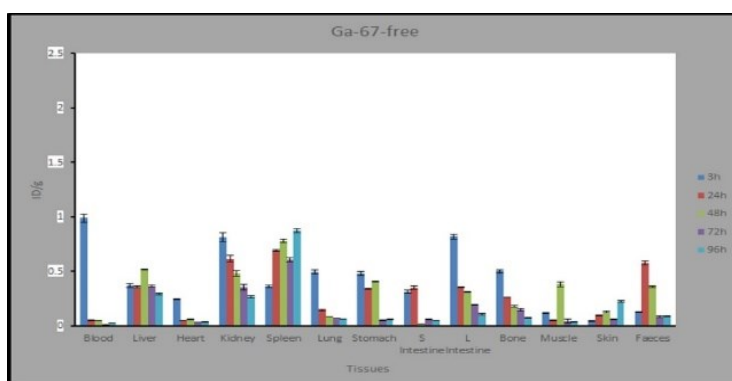
$^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  نسبت به رده سلولی SW480 در غلظت‌های مختلف سلولی (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).

۵.۳. نتایج حاصل از داخلی سازی رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  در رده سلولی SW480

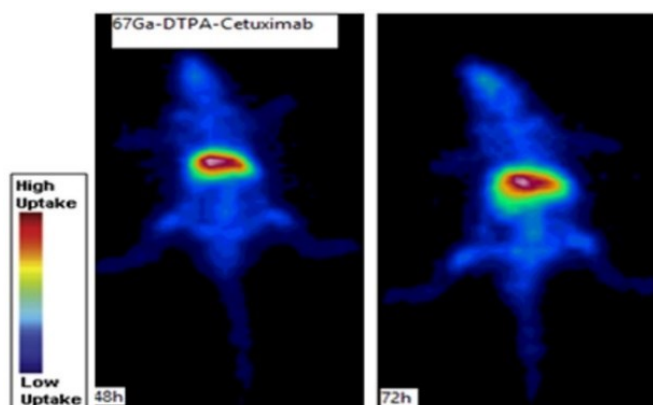
درصد اینترنالیزاسیون رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab}$  در رده سلولی SW480 در زمان‌های مختلف (۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸، ۳۲، ۳۶ و ۴۸ ساعت) با توجه به نتایج که در شکل ۶ نشان داده شده است، بیان‌گر این مفهوم است که بیشترین مقدار رادیوایمونوکنژوگه بین ۴ تا ۸ ساعت پس از آغاز سنجش بالاترین مقدار است و حدود ۸۰٪ است. این مقدار با گذشت زمان رو به کاهش است، به طوری که پس از ۴۸ ساعت به کمتر از ۵۰٪ می‌رسد.



شکل (۷): درصد دوز تزریق شده (هر دوز تزریقی شامل ۴۰ میکروگرم آنتی‌بادی با اکتیویته ۲۰۰ میکروکوری) به هر گرم بافت (ID/g) از رادیوایمونوکنژوگه <sup>۶۷</sup>Ga-CHX-A''-DTPA-Cetuximab در رت‌های سالم در فواصل زمانی مختلف ۳، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تزریق (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).



شکل (۸): درصد دوز تزریق شده (هر دوز تزریقی شامل ۲۰۰ میکروکوری رادیوایزوتوپ آزاد) به هر گرم بافت (ID/g) از گالیم-۶۷ آزاد در رت‌های سالم در فواصل زمانی مختلف ۳، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تزریق (هر آزمایش سه بار تکرار شده است).



شکل (۹): تصویر برداری از رت‌های نر سالم به روش رادیوایمونوسیتی‌گرافی از کل بدن با استفاده از دوربین Dual head SPECT واقع در گروه پژوهشی پزشکی هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات پزشکی، کشاورزی و صنعتی کرج، (هر دوز تزریقی شامل ۴۰ میکروگرم آنتی‌بادی با اکتیویته ۲۰۰ میکروکوری).

## ۴. بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش مراحل کامل تخلیص، کانژوگاسیون، نشان دار سازی، کنترل کیفی، مطالعه پایداری، تست های برون تنی ایمونوراکتیویته و ایترنالیزاسیون و همچنین بررسی توزیع زیستی و مطالعات تصویربرداری در رت های سالم، برای یک گونه آنتی بادی نشان دار بر پایه فرمول دارویی بازاری موسوم به ستوکسیمب انجام گرفت پادتن مورد نظر بر علیه اپی توپ های آنتی ژن EGFR عمل می کند. آنتی بادی برای نشان دار سازی با گالیم-۶۷ به شکل کنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A}^{\text{DTPA}}\text{-}(\text{anti-EGFR})$  فرآوری و تخلیص گردید و نهایتاً مراحل نشان دار سازی، تخلیص، کنترل شیمیایی، رادیوشیمیایی برای ترکیب نشان دار انجام شد، پس از بهینه سازی فرایند نشان دار سازی به دلیل قابلیت نشان دار سازی بهینه تر، کنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A}^{\text{DTPA}}\text{-}(\text{anti-EGFR})$  با نسبت تعداد شلاتور به آنتی بادی در حدود ۴/۱ برای طی مراحل بعدی که شامل مطالعه اتصال به سلول های دارای آنتی ژن EGFR (ایمونوراکتیویته)، ایترنالیزاسیون سلولی و مطالعات پایداری در مجاورت سرم انسانی و محلول بافر فسفات انتخاب گردید. در خصوص تعداد شلاتورهای قابل اتصال به هر آنتی بادی، زیرمن و همکاران در مطالعه نشان دار سازی آنتی بادی  $\text{chCEV}$  با رادیونوکلید  $^{64/67}\text{Cu}$  با واسطه چندین شلاتور و هریک در نسبت های مولی متفاوت به آنتی بادی، به این نتیجه رسیدند که افزایش تعداد شلاتورهای متصل به آنتی بادی سبب کاهش ایمونوراکتیویته آن می گردد و همچنین بیان نمودند که حداکثر تعداد مجاز شلاتور متصل شده به هر آنتی بادی یا به عبارت دیگر حداکثر نسبت قابل قبول  $c/a$  برابر ۱۰ تا ۱۱ است ولی اشاره می کند که مناسب ترین نسبت  $c/a$  برای یک رادیوایمونوکنژوگه تشخیصی ۳ تا ۵ است زیرا نسبت بالاتر، همان طور که گفته شد سبب تخریب ساختار فضائی آنتی بادی گردیده و از سوی دیگر نسبت کمتر  $c/a$  نیز به نوعی سبب کاهش تعداد رادیونوکلیدها

در بافت هدف و در نتیجه کاهش حساسیت تصویربرداری می گردد [۲۳،۲۲]، بر همین اساس نسبت تعداد شلاتور به آنتی بادی در حدود ۴/۱ برای طی مراحل بعدی این مطالعه انتخاب گردید.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A}^{\text{DTPA}}\text{-}(\text{anti-EGFR})$  را کمپلکس تشخیصی مناسب با خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۸٪ و ابقای خاصیت ایمنی (ایمونوراکتیویته) در حدود ۸۳٪ و همچنین ایترنالیزاسیون حداکثری بین ۷۰٪ تا ۸۰٪ در سلول های SW۶۲۰ بین ۴ تا ۸ ساعت پس از آغاز سنجش، نشان می دهد. پایداری برون تنی این ترکیب در بافر فسفات و سرم انسانی تا ۲۴ ساعت پس از تهیه به ترتیب بیشتر از ۹۸٪ و ۹۳٪ و در شرایط مشابه ۴۸ ساعت پس از تهیه به ترتیب بیشتر از ۹۷٪ و ۹۱٪ به دست آمد. نتایج مطالعات پایداری نشان می دهد که رادیوایمونوکنژوگه مورد نظر در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از شروع مطالعه مناسب ترین پایداری را برای مطالعه تصویربرداری نشان می دهد، نتایج به دست آمده در این بخش به طور معنی داری توسط مطالعات قبلی همین گروه بر روی رادیوایمونوکنژوگه  $^{64}\text{Cu-DOTA-PR8}$  تأیید می گردد [۵].

نتایج حاصل از توزیع زیستی رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A}^{\text{DTPA}}\text{-}(\text{anti-EGFR})$  در شکل ۷ در حقیقت نشان دهنده تجمع این رادیوایمونوکنژوگه در زمان های مختلف ۳، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تزریق در بافت های مختلف است، در حالی که شکل ۸ بیانگر توزیع زیستی رادیوایزوتوپ گالیم-۶۷ به صورت آزاد است که در واقع به عنوان تست کنترل مورد استفاده قرار می گیرد، به عنوان مثال تجمع رادیوایمونوکنژوگه در تمامی زمان های مطالعه در کبد و طحال که بافت های اصلی در مسیر دفعی این رادیوایمونوکنژوگه

منظور استفاده در بالین با هدف تشخیص و نیز پایش مراحل درمانی با استفاده از سیستم تصویربرداری SPECT در افراد مبتلا به انواع سرطان با بیان بالای گیرنده EGFR است.

هستند به مراتب از گالیم-۶۷ آزاد بیشتر است که بیانگر پایداری کمپلکس مذکور در شرایط درون تنی است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که رادیوایمونوکنژوگه  $^{67}\text{Ga-CHX-A}''\text{-DTPA-Cetuximab}$  کاندیدی مناسب به

## ۵. مراجع

1. J. R. Murren, H. J. Durivage, A. C. Buzaid, M. Reiss, S. D. Flynn, D. Carter, W. N. Hait. Trifluoperazine as a modulator of multidrug resistance in refractory breast cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38 (1) (1996) 65-70.
2. S. Rahmani, P. Rikhtechi, S. Rasaneh, Z. Sheikholislam, I. Shahhosseini. Development of DOTA-Rituximab to be Labeled with  $^{90}\text{Y}$  for Radioimmunotherapy of B-cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Iran J. Pharm. Res.* 16 (2) (2017) 619-629.
3. T. M. Pierpont, C. B. Limper, K. L. Richards. Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front. Oncol.* 8 (2018)163.
4. D. E. Milenic, E. D. Brady, M. W. Brechbiel. Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (6) (2004) 488-499.
5. B. Alirezapour, M. J. Rasae, A. R. Jalilian, S. Rajabifar, J. Mohammadnejad, M. Paknejad, E. Maadi, S. Moradkhani. Development of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-PR81 radioimmunoconjugate for MUC-1 positive PET imaging. *Nucl. Med. Biol.* 43 (1) (2016) 73-80.
6. S. A. Abadi, B. Alirezapour, I. Kertész, M. J. Rasae, J. Mohammadnejad, M. Paknejad, H. Yousefnia, S. Zolghadri. Preparation, quality control and biodistribution assessment of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-PR81 in BALB/c mice bearing breast tumors. *J. Label Compd. Radiopharm.* 64 (4) (2021)168-180.
7. B. Alirezapour, A. R. Jalilian, S. Rajabifar, M. Mirzaii, S. Moradkhani, M. Pouladi, G. Aslani. Preclinical evaluation of  $^{111}\text{In}$ -DOTA-trastuzumab for clinical trials. *J. Cancer Res. Ther.* 10 (2014) 112-120.
8. D. Abshire, M. K. Lang. The evolution of radiation therapy in treating cancer. *Semi. Oncol. Nursing* 34 (2) (2018) 151-157.
9. D. M. Goldenberg. Radiolabelled monoclonal antibodies in the treatment of metastatic cancer. *Current oncology* (Toronto, Ont). 14 (1) (2007) 39-42.
10. R. M. Sharkey, D. M. Goldenberg. Perspectives on cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.* 46 (Suppl 1) (2005) 115s-127s.
11. B. Alirezapour, A. R. Jalilian, F. Bolourinovin, S. Moradkhani. Production and quality control of  $^{67}\text{Ga}$ -DOTA-trastuzumab for radioimmunoscintigraphy. *Iran J. Pharm. Res.* 12 (2) (2013) 355-366.
12. L. Lattuada, A. Barge, G. Cravotto, G. B. Giovenzana, L. Tei. The synthesis and application of polyamino polycarboxylic bifunctional chelating agents. *Chem. Soc. Rev.* 40 (5) (2011) 3019-3049.
13. M. Kameswaran, U. Pandey, C. Dhakan, K. Pathak, V. Gota, K. V. Vimalnath, Ashutosh Dash, Grace Samuel. Synthesis and Preclinical Evaluation of  $^{177}\text{Lu-CHX-A}''\text{-DTPA-Rituximab}$  as a Radioimmunotherapeutic Agent for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Biot. Radiopharm.* 30 (6) (2015) 240-246.
14. J. A. Bonner, P. M. Harari, J. Giralto, N. Azarnia, D. M. Shin, R. B. Cohen, C. U Jones, R. Sur, David Raben, J. Jassem, R. Ove, M. S Kies, J. Baselga, H. Youssoufian, N. Amellal, E. K. Rowinsky, K. K. Ang. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 354 (6) (2006) 567-578.
15. M. Guleria, T. Das, Ch. Kumar, J. Amirdhanayagam, H. D. Sarma, S. Banerjee. Preparation of clinical-scale  $^{177}\text{Lu}$ -Cetuximab: Optimization of protocols for conjugation, radiolabeling, and freeze-dried kit formulation. *J. Labelled Comp. Radiopharm.* 60 (5) (2017) 234-241.
16. L. K. Van Dijk, C. B. Yim, G. M. Franssen, J. H. Kaanders, J. Rajander, O. Solin, T. J. Grönroos,

- O. C. Boerman, J. Bussink. PET of EGFR with  $^{64}\text{Cu}$ -cetuximab-F(ab')<sub>2</sub> in mice with head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Contrast Media Mol Imaging* 11 (1) (2016) 65-70.
17. F. Petrelli, A. Coinu, V. Riboldi, K. Borgonovo, M. Ghilardi, M. Cabiddu, V. Lonati, E. Sarti, S. Barni. Concomitant platinum-based chemotherapy or cetuximab with radiotherapy for locally advanced head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis of published studies. *Oral Oncol.* 50 (11) (2014) 1041-1048.
18. C. G. Pippin, T. A. Parker, T. J. McMurry, M. W. Brechbiel. Spectrophotometric method for the determination of a bifunctional DTPA ligand in DTPA-monoclonal antibody conjugates. *Bioconjugate Chem.* 3 (4) (1992) 342-345.
19. T. Lindmo, E. Boven, F. Cuttitta, J. Fedorko, P. A. Bunn. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods* 72 (1) (1984) 77-89.
20. S. Matzku, G. Moldenhauer, H. Kalthoff, S. Canevari, M. Colnaghi, J. Schuhmacher, H. Bihl. Antibody transport and internalization into tumours. *Br. J. Cancer Suppl.* 10 (1990) 1-5.
21. M. Guleria, T. Das, C. Kumar, R. Sharma, J. Amirdhanayagam, H. D. Sarma, A. Dash. Effect of Number of Bifunctional Chelating Agents on the Pharmacokinetics and Immunoreactivity of  $^{177}\text{Lu}$ -labeled Rituximab: A Systemic Study. *Anticancer. Agents. Med. Chem.* 18 (1) (2018) 146-153.
22. B. Alirezapour, A. R. Jalilian, M. J. Rasaei, S. Rajabifar, K. Yavari, M. Kamalidehghan, F. Bolourinovin, G. Aslani. Optimized preparation and preliminary evaluation of  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-trastuzumab for targeting ErbB2/Neu expression. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 295 (2013) 1261-1271.
23. K. Zimmermann, J. Grunberg, M. Honer, S. Ametamey, P. A. Schubiger, I. Novak-Hofer. Targeting of renal carcinoma with  $^{67/64}\text{Cu}$ -labeled anti-L1-CAM antibody chCE7: selection of copper ligands and PET imaging. *Nucl. Med. Biol.* 30 (2003) 417-427.