

NUEVO RADIOINMUNOCONJUGADO ⁹⁰Y-DOTA-H-R3. SÍNTESIS Y RADIOMARCAJE

Denis R. Beckford Vera, Abmel Xiques Castillo, René Leyva Montaña, Marylaine Pérez Malo Cruz,
 Edgar Casanova González, Minely Zamora Barrabí
 Centro de Isótopos (CENTIS)
 Ave. Monumental y Carretera La Rada, Guanabacoa, Ciudad de La Habana, Cuba
 beckford@centis.edu.cu

Resumen

El marcaje de anticuerpos monoclonales con metales radiactivos para diagnóstico y terapia generalmente involucra el uso de agentes quelatantes bifuncionales que contienen una función reactiva para conjugarse con las proteínas y un grupo capaz de enlazar fuertemente al metal formando complejos fisiológicamente estables. El objetivo del trabajo fue modificar el anticuerpo monoclonal humanizado (h-R3) con el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) en solución acuosa, realizar el marcaje de los conjugados obtenidos con ⁹⁰Y y estudiar algunas de las variables que influyen en la reacción, así como la estabilidad del radioinmunoconjugado en presencia de otros agentes quelatantes.

NEW RADIOIMMUNOCONJUGATE ⁹⁰Y-DOTA-H-R3. SYNTHESIS AND RADIOLABELING

Abstract

Labelling of monoclonal antibodies with radioactive metals for cancer diagnosis and therapy has usually been accomplished by the use of bifunctional chelating agents, which contain both a reactive functionality for covalent attachment to proteins and a strong metal-binding group capable of forming a physiologically stable complex with the radionuclide. The objective of the present work was to modify the humanized monoclonal antibody (h-R3) with the 1,4,7,10-tetraaza-cyclododecane N,N',N'',N'''-tetraacetic acid (DOTA) in aqueous solution, achieve the labelling of the obtained conjugates with ⁹⁰Y and study some of the variables that influence in the labelling reaction, as well as the stability of the radioimmunoconjugate in presence of other chelating agents.

Key words: monoclonal antibodies, diagnosis, neoplasms, labelled compounds, yttrium 90

INTRODUCCIÓN

A pesar de los retos, los anticuerpos monoclonales marcados con radiometales emisores β⁻ continúan siendo una opción viable para la radioinmunoterapia del cáncer. Sin embargo, la terapia de tumores sólidos continúa siendo un desafío para la comunidad científica, ya que las dosis que son efectivas en los tumores hematológicos son insuficientes en los tumores epiteliales más comunes; a pesar de que los ensayos clínicos han demostrado avances en tratamientos locoregionales y de metástasis residuales mínimas [1].

Generalmente, el marcaje de anticuerpos monoclonales (mAb) con radionúclidos metálicos involucra el uso de agentes quelatantes bifuncionales (AQBFs) con el objetivo de formar radioinmunoconjugados con una alta estabilidad bajo condiciones fisiológicas [2-5,6]. Los derivados del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y el DOTA han sido los agentes quelatantes bifuncionales más empleados para el marcaje de biomoléculas con radisótopos metálicos, principalmente radiolantánidos. Lewis y cols [7,8] desarrollaron un método simple, eficiente y económico para enlazar agentes quelatantes bifuncionales a proteínas. A partir de entonces, esta metodología ha sido empleada

con éxito por otros autores para el marcaje de anticuerpos monoclonales, principalmente con radiolantánidos [9].

En el trabajo nos propusimos conjugar el anticuerpo monoclonal humanizado h-R3 con DOTA empleando dos vías, conjugación directa con N-hidroxisuccinimida-DOTA (DOTA-NHS) comercial y el método reportado por Lewis y cols con algunas modificaciones. Los conjugados obtenidos se caracterizaron por HPLC y posteriormente se marcaron con ⁹⁰Y. Se realizó un estudio de estabilidad en exceso de DTPA para evaluar la posible transquelación del radionúclido metálico del radioinmunoconjugado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpo monoclonal

El anticuerpo monoclonal anti-EGF humanizado h-R3 (TheraCIM®), proteína de isotipo IgG, que reconoce con elevada especificidad el dominio externo del EGF-R, fue suministrado por el Centro de Inmunología Molecular (CIM, Cuba).

Reactivos

Los ligandos DOTA y DOTA-NHS se adquirieron de Macrocylics Dallas TX. La 1-etil-3-[3-

(dimetilamina) propil] carbodiimida (EDC) y la N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) se adquirieron de la firma Pierce, Rockford, IL. Se empleó agua ultrapura (18,2 MΩ/cm, EURO 60-integra plus, Alemania). El $^{90}\text{YCl}_3$ se obtuvo a partir de un generador cromatográfico ^{90}Sr - ^{90}Y (CENTIS).

Instrumentación general

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó con un equipo Shimadzu (Japón), equipado con un inyector manual Rheodyne, bombas LC-6A, desgasificador DGU-3A, detector UV SPD-6AV, integrador CROMATOPAC CR4AX y un colector de fracciones 2112 REDIRAC (BROMMA). La concentración del anticuerpo monoclonal se determinó en un espectrofotómetro UV-visible (spectronic GENESYS, Milton Roy, USA). La medición de la actividad se realizó en un contador de centelleo líquido (LKB-WALLAC-RacBeta 1209, Finlandia) y en un calibrador de dosis CMR 35 (Capintec, EEUU).

Conjugación del anticuerpo monoclonal h-R3

DOTA-OSSu-h-R3 (método in situ). Para conjugar el anticuerpo monoclonal h-R3 con DOTA se empleó una variante del método de Lewis y cols [7, 8]. Una solución de DOTA (20 mg, 0,049 mmol) en 500 μl de agua se mezcló con 100 μl de sulfo-NHS (10,7 mg, 0,049 mmol) también disuelto en agua y se ajustó el pH de la mezcla de ambas soluciones a ~5,8 con 110 μl de NaOH 1M, la solución resultante se enfrió a 4°C. A la mezcla anterior se le adicionó 153 μl de una solución de EDC (9,5 mg, 0,049 mmol) preparada momentos antes de utilizarla. La mezcla de reacción se agitó por 45 min a 4°C, el pH se ajustó a 7,0 con Na_2HPO_4 0,2 M pH-9,0 y se mezcló sin previa purificación con la solución concentrada del anticuerpo monoclonal h-R3 (10,5-11,7 mg/mL).

DOTA-NHS-h-R3 (conjugación directa). Al DOTA-NHS sólido se le adicionó buffer fosfato de sodio 0,1 M pH-8,0. La solución anterior se mezcló con el anticuerpo monoclonal previamente concentrado disuelto en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH-7,0.

Se estudiaron tres relaciones molares AQBf:mAb en cada caso, 600:1, 500:1 y 200:1. A las mezclas de reacción se les ajustó el pH hasta 8,0 con una solución saturada de Na_3PO_4 y se incubaron toda la noche a 4°C. La purificación de los DOTA-conjugados se realizó empleando cromatografía de exclusión molecular en una columna empaquetada con Sephadex G-50 (280 x 5 mm) previamente lavada con una solución de HCl 0,5 M para eliminar la presencia de posibles cationes metálicos, posteriormente se equilibró con buffer acetato NH_4OAc 0,1 M (1,0% HSA) pH-7,0, se eluyó con buffer acetato de amonio 0,1M pH-7,0 y se colectaron fracciones de 0,5 mL. La concentración de la proteína modificada se determinó empleando el ensayo de Bradford. Para determinar los

agregados de alto peso molecular que se pudieran formar en el proceso de conjugación y la integridad de los conjugados se utilizó HPLC de exclusión molecular (HPLC-EM) empleando una columna Protein Pack SW300 Waters (7,5 x 300 mm, 10 μm , Waters), se inyectaron 20 μl de la muestra, como fase móvil se utilizó NaCl 0,9% con un flujo de 1 mL/min.

Determinación del número promedio de agente quelatante bifuncional enlazado a una molécula de anticuerpo monoclonal

Para determinar la cantidad de grupos DOTA enlazados a una molécula de anticuerpo monoclonal h-R3 se empleó una variante del método de Meares y colaboradores [11]. Se mezcló 53 μl de una solución de YCl_3 (555 μM , 0,029 μmoles) que tenía ~5,5 x 10⁶ cpm/ μl ; 53 μl de buffer acetato de amonio 0,5 M, pH-7,0 y 90 μl , (0,0024-0,0029 μmoles) de DOTA-h-R3. La mezcla se hizo reaccionar por 3 horas a 42°C y posteriormente se le añadió 22 μl de DTPA 10 mM pH-6 y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó 1,5 μl de la mezcla de reacción sobre una tira de ITLC-SG (1x10 cm) y se desarrolló en NH_4OAc (10% m/v): Metanol (1:1). La tira se cortó 1 cm por encima del punto de aplicación y ambas fracciones se midieron en un contador de centelleo líquido.

Radiomarcaje

En un tubo Eppendorf se mezclaron alícuotas de ^{90}YCl (3-14 mCi, 3-12 μl) en una solución de HCl 0,05 N, entre 100 y 150 μl de buffer acetato de amonio 0,5 M pH-7,0 y 100 μl (~0,400 mg) del conjugado DOTA-h-R3. La mezcla de reacción se incubó a 42°C por 1 h, transcurrido este tiempo se le adicionó 1/9 del volumen de reacción de una solución de DTPA 10 mM pH-6,0 para acomplejar el ^{90}Y que no reaccionó y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Utilizando diseños experimentales se evaluó la influencia del tiempo de incubación y el pH del buffer en el rendimiento de marcaje. Las relaciones molares escogidas fueron 500:500:500:1 (método in situ) y 200:1 (conjugación directa). Se mezclaron 3 mCi de ^{90}Y en una solución de HCl 0,05 N, 100 μl de buffer acetato de amonio pH-7,0 o pH-8,0 y ~0,3 mg de cada conjugado. Las mezclas de reacción se incubaron a 42°C y la determinación del rendimiento de marcaje se realizó a 1 h y 3 h. Los datos obtenidos se analizaron con el software estadístico STAGRAPHS[®] Plus versión 5.1.

Determinación del rendimiento de marcaje

El rendimiento de marcaje se determinó utilizando cromatografía instantánea de capa delgada (ITLC[™] SG, Silica Gel Impregnated Glass Fiber Sheets, Pall) 1 x 10 cm, se usó una mezcla de acetato de amonio (10% m/v) y metanol (1:1) como fase móvil. En este sistema el radioinmunoconjugado se mantiene en el punto

de aplicación ($R_f=0$), mientras que el ^{90}Y acomplejado por el DTPA migra hasta $R_f=0,5-0,9$. También para algunos casos el rendimiento de marcaje se chequeó por HPLC utilizando una columna TSK-Gel SW3000 (7,5 x 300 mm, 10 μm , TosoHass) usando NaCl (0,9%, 0,05% NaN_3) en régimen isocrático como fase móvil. Se colectaron fracciones de 0,5 mL y se midieron en un contador de centelleo líquido.

Estudio de estabilidad in vitro en exceso de DTPA

El radioinmunoconjugado ^{90}Y -DOTA-h-R3 (20-80 μL , >156 μCi) previamente purificado se adicionó a 1 mL de DTPA 1 mM en NaCl 0,9% y se incubó a 37°C. Se aplicaron alícuotas de 1-4 μL sobre tiras de papel ITLC/SG y se desarrollaron en $\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OAc}$ (10% m/v) 1:1, posteriormente la tira se cortó 1 cm por encima del punto de aplicación y ambas fracciones se midieron en un

contador Rackbeta. De la misma forma fue comprobado por HPLC-EM utilizando buffer NH_4OAc 0,01 M como fase móvil. Las muestras se analizaron en intervalos de 24-72 h por un periodo de nueve días.

RESULTADOS

Conjugación del anticuerpo monoclonal h-R3

El porcentaje de agregados moleculares formados se tomó como el área debajo del pico anterior al pico correspondiente al conjugado como se aprecia en la figura 1. En ningún caso se observó la formación de fragmentos como consecuencia de la reacción de conjugación. Los resultados de la cantidad de moléculas de AQBf enlazadas a una molécula de anticuerpo monoclonal y el nivel de formación de agregados moleculares se muestran en la tabla 1.

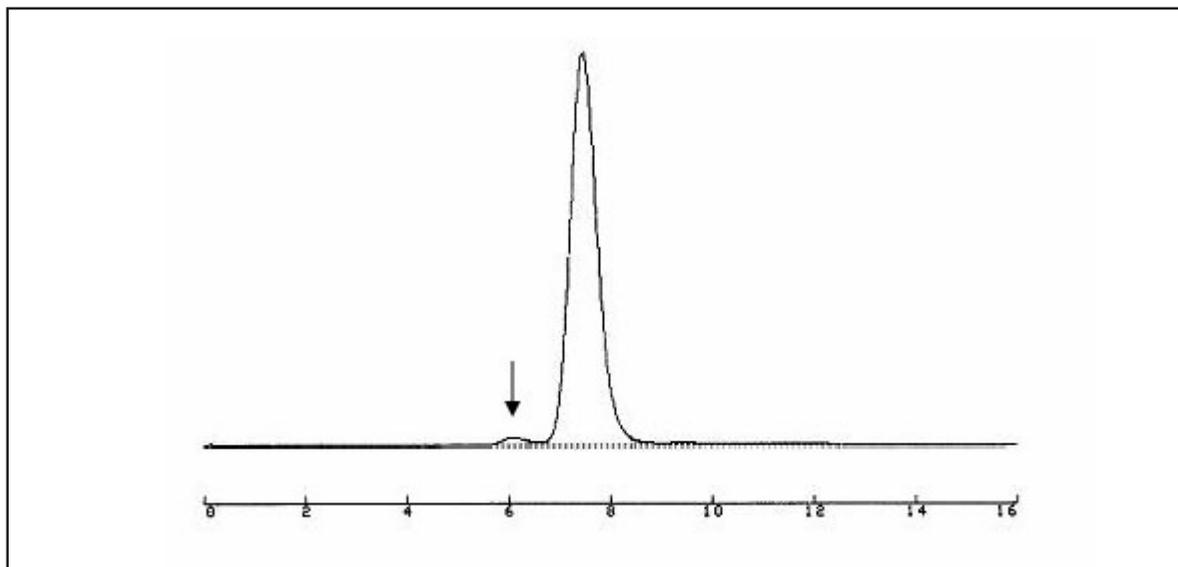


Figura 1. Perfil cromatográfico del conjugado purificado.

Tabla 1. Resultados de la conjugación del h-R3

Método	Relación Molar	Ligando/h-R3	% agregados
DOTA:sulfo-NHS:EDC:h-R3	600:600:600:1	5,4	12,7
	500:500:500:1	5,1	12,2
	200:200:200:1	1,8	4,2
DOTA-NHS:h-R3	600:1	6,2	3,2
	500:1	6,0	3,0
	200:1	5,3	1,9

Radiomarcaje

Se realizaron marcajes de todos los conjugados obtenidos por las dos vías utilizadas para modificar el h-R3 con DOTA. Los resultados del radiomarcaje se muestran en la tabla 2. Después de la purificación la pureza radioquímica para todos los radioinmunoconjugados obtenidos por la primera variante fue superior a 97% y superior a 98% para la segunda, determinado por ITLC-SG y chequeado por HPLC-EM. Las condiciones óptimas de marcaje se identificaron como 1,5 h y pH=8,0. Bajo estas condiciones se obtuvieron rendimientos de marcaje de $88,5 \pm 1,9\%$ (n=5) para el conjugado obtenido por el método in situ y $92,1 \pm 3,1\%$ (n=5) para el conjugado obtenido por la modificación del h-R3 con DOTA-NHS.

Estudio de estabilidad en exceso de DTPA

La estabilidad del radioinmunoconjugado ^{90}Y -DOTA-h-R3 se evaluó en presencia de exceso de DTPA. La relación molar DTPA: ^{90}Y -DOTA-h-R3 fue 24503:1 para el caso del conjugado obtenido por el método in situ y 20900:1 para el conjugado obtenido por reacción directa del DOTA-NHS con el h-R3. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2.

DISCUSIÓN

El ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético y sus derivados se han empleado con éxito en el radiomarcaje de anticuerpos monoclonales con ^{90}Y debido a que forman complejos altamente estables en medio fisiológico con este radionúclido [7, 8, 12, 13].

Generalmente la activación del DOTA involucra más de un paso de síntesis, como consecuencia escogimos el método desarrollado por Lewis y colaboradores [7,8] para activar el grupo carboxilo del agente quelatante bifuncional (DOTA) y posteriormente modificar el anticuerpo monoclonal h-R3. Este método ofrece conjugados de hasta 5,6 quelatos por molécula de anticuerpo para relaciones molares AQBf:mAb hasta 408:1, preservando la inmunoreactividad del anticuerpo modificado superior al 90% [14]. Teniendo en cuenta que en el método descrito nos resulta difícil conocer la concentración real del DOTA activado, decidimos usar también DOTA-NHS comercial para modificar el anticuerpo monoclonal h-R3.

Las relaciones molares estudiadas están basadas en estudios realizados anteriormente en

Tabla 2. Resultados del radiomarcaje de los inmunoconjugados con ^{90}Y

Método	Relación Molar	n	Rendimiento (%) (media ± d.s)	Actividad Específica (mCi/mg)
DOTA: sulfo-NHS: EDC: h-R3	600:600:600:1	3	$81,7 \pm 6,2$	6,1-18,2
	500:500:500:1	7	$81,3 \pm 4,3$	5,6-16,6
	200:200:200:1	3	$25,0 \pm 4,6$	-
DOTA-NHS: h-R3	600:1	3	$89,9 \pm 3,9$	10,4-30,6
	500:1	4	$88,5 \pm 3,0$	8,9-24,5
	200:1	9	$91,8 \pm 6,8$	8,4-29,5

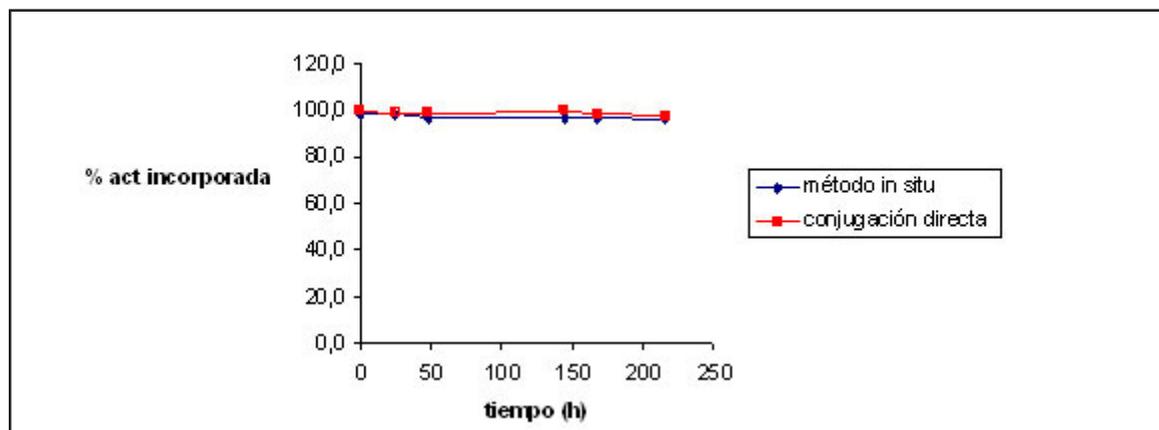


Figura 2. Estudio de estabilidad in vitro en exceso de DTPA.

nuestro laboratorio, donde se activó el grupo carboxilo del DOTA empleando NHS y DCC en medio de DMSO, resultando que sólo cuando la relación molar AQBf:mAb fue mayor que 400:1 los resultados del marcaje, expresados en pureza radioquímica, fueron satisfactorios manteniendo la inmunoreactividad por encima del 90% [15].

La purificación de la mezcla de conjugación es una etapa muy importante en el desarrollo del inmunoconjugado, ya que es donde se elimina el agente quelatante en exceso que no se enlazó a la proteína, garantizando en lo adelante que no exista, o al menos se reduzca al mínimo, la competencia del AQBf no conjugado por el radionúclido. Varios métodos se han reportado para lograr dichas separaciones, las más empleadas son: diálisis, exclusión molecular por centrifugación y exclusión molecular por columna. La diálisis, método más utilizado, garantiza la separación casi completa del AQBf no quelatado empleando chelex 100 y numerosos cambios de buffer. En este proceso Lewis y cols [7,8] y Berger y cols [13] utilizaron ~150 y ~90 h respectivamente. Coliva, Zacchetti y cols [16] reportaron la purificación del conjugado Bz-DOTA-mAb mediante cromatografía de exclusión molecular usando columnas comerciales PD-10, proceso que se realiza en pocos minutos con resultados satisfactorios. En nuestro caso decidimos emplear cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna empaquetada con Sephadex G-50 de dimensiones 0,5 x 28 cm, con la cual se logró una buena separación del AQBf que no reaccionó comprobado por HPLC-EM.

La cantidad de grupos DOTA enlazados a una molécula de anticuerpo monoclonal se vio influenciada por el exceso de AQBf empleado para modificar la biomolécula. Sin embargo no existe diferencia sustancial para las relaciones molares AQBf/mAb 500:1 y 600:1, lo cual sugiere que ocurre una saturación de los grupos ε-amino de los residuos de lisina, grupo fundamental donde se espera se produzca el enlace amida entre el agente quelatante bifuncional y la proteína. Los rendimientos de marcaje obtenidos en nuestros experimentos son satisfactorios y se corresponden con los datos reportados por otros autores [8,12,17], sin embargo, para la relación molar DOTA:sulfo-NHS:EDC:h-R3 (200:200:200:1) los rendimientos no superaron el 25%, lo cual está relacionado con la cantidad de grupos DOTA enlazados a una molécula de h-R3.

Los resultados del diseño de experimento evidenciaron que existe una dependencia entre el pH de la reacción de marcaje y el rendimiento de la reacción. En la medida que se aumenta el pH del buffer aumenta la rapidez de incorporación del radiometal al inmunoconjugado en el intervalo estudiado.

Los resultados obtenidos en la incubación del radioinmunoconjugado en exceso de DTPA

evidencian su estabilidad, corroborando los resultados reportados por otros autores [9,18] para radioinmunoconjugados basados en anticuerpos monoclonales marcados con ⁹⁰Y, empleando DOTA y sus derivados como agentes quelatantes bifuncionales. El ⁹⁰Y que no se mantiene asociado al conjugado se pudiera deber a la presencia de pequeñas cantidades de agentes quelatantes que no se lograron separar en el proceso de purificación y que no se detectan por los métodos empleados.

CONCLUSIONES

La metodología descrita permitió obtener de forma rápida y sencilla el conjugado DOTA-h-R3 modificando el anticuerpo monoclonal humanizado (h-R3) con DOTA por dos vías sin afectar la integridad de la molécula. Los conjugados obtenidos presentan entre 1,8 y 6,7 moléculas de DOTA enlazadas a una molécula de anticuerpo monoclonal h-R3 y se logró un marcaje estable de los conjugados obtenidos con ⁹⁰Y con rendimientos y estabilidad satisfactorios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SHARKEY, R. M., GOLDENBERG, D. M., Perspectives on Cancer Therapy with Radiolabeled Monoclonal Antibodies. *J. Nucl. Med.* 46 (2005)115S-127S.
- [2] MCCALL, M. J., DIRIL, H., MEARES, C. F., Simplified Method for Conjugation Macrocylics Bifunctional Chelating Agents to Antibodies via 2-Iminothiolane. *Bioconjugate Chem.* 1 (1990)222-226.
- [3] LI, M., MEARES, C. F., Synthesis, metal chelate stability studies, and enzyme digestion of a peptide-linked DOTA derivative and its corresponding radiolabeled immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* 4 (1993)275-283.
- [4] PANWAR, P., IZNAGA-ESCOBAR, N., MISHRA, P., SRIVASTAVA, V., SHARMA, K. R., CHANDRA, R., MISHRA, A. K., Radiolabeling and biological Evaluation of DOTA-Ph-AI Derivative Conjugated to Anti-EGFR Antibody for egf/r3 Targeted tumor Imaging and Therapy. *Cancer Biology and Therapy* 4:8 (2005)e63-e69.
- [5] MOHSIN, H., JIA, F., SIVAGURU, G., HUDSON, M. J., SHELTON, T. D., HOFFMAN, T. J., CUTLER, C. S., KETRING, A. R., ATHEY, P. S., SIMÓN, J., R., FRANK, K., JURISSON, S. S., LEWIS, M. R., Radiolanthanide-Labeled Monoclonal Antibody CC49 for Radioimmunotherapy of Cancer: Biological Comparison of DOTA Conjugates and ¹⁴⁹Pm, ¹⁶⁶Ho, and ¹⁷⁷Lu. *Bioconjugate Chem.* 17 (2006)485-492.
- [6] LIU, S., EDWARDS, D.S., Bifunctional chelators for therapeutic lanthanide radiofarmaceuticals. *Bioconjugate Chem.* 12 (2001)7-34.
- [7] LEWIS, M. R., RAUBITSCHKEK, A., SHIVELY, J. E., A Facile, Water-Soluble Method for Modification of Proteins with DOTA. Use of Elevated Temperature and Optimized pH To Achieve High Specific Activity and High Chelate Stability in Radiolabeled Immunoconjugates. *Bioconjugate Chem.* 5 (1994)565-576.
- [8] LEWIS, M. R., JIM, Y. K., ANNE-LINE, J. A., SHIVELY, J. E., RAUBITSCHKEK, A., An improved method for conjugating monoclonal antibodies with N-hydroxysulfosuccinimidyl DOTA. *Bioconjugate Chem.* 12 (2001)320-324.
- [9] GRIFFITHS, G. L., GOVINDAN, S. V., SHARKEY, R. M., FISHER, D. R., GOLDENBERG D. M., ⁹⁰Y-DOTA-hLL2: An Agent for Radioimmunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Nucl. Med.* 44 (2003)77-84.
- [10] BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the

quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* (1976)72:248.

[11] MEARES, C. F., MCCALL, M. J., REARDAN, D. T., GOODWIN, D. A., DIAMANTI, C. I., MCTIGUE, M., Conjugation of Antibodies with Bifunctional Chelating Agents: Isothiocyanate and Bromoacetamide Reagents, Methods of Analysis, and Subsequent Addition of Metal Ions. *Anal. Biochem.* 142 (1984)68-78.

[12] SERENGULAN, V. G., LISA, B. S., GOLDENBERG, D. M., ROBERT, M. S., HABIBE, K., JOSEPH, E. D., MICHELE, J. L. H., GARY L. G., ⁹⁰Yttrium-labeled complementary-determining-region-grafted monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: radiolabeling and animal biodistribution studies. *Bioconjugate Chem.* 9 (1998)773-782.

[13] BERGER, M. A., MASTERS, G. R., SINGLETON, J., SCULLY, M. S., GRIMM, L. G., SOLTIS, D. A., ALBONE, E. F., Pharmacokinetics, Biodistribution and Radioimmunotherapy with Monoclonal antibody 776.1 in a Murine Model of Human Ovarian Cancer. *Cancer biotherapy & Radiopharmaceuticals.* 20, 6 (2005)589-601.

[14] SMITH, A., ALBERTO, R., BLAEUENSTEIN, P., NOVAK-

HOFER, I., MAECKE, H. R., SCHUBIGER, P. A., Preclinical Evaluation of ⁶⁷Cu-labeled Intact and Fragmented Anti-Colon Carcinoma Monoclonal Antibody MAb35. *Cancer Res.* 53 (1993)5727-5733.

[15] LEYVA, R., PERERA, A., XIQUES, A., HERNÁNDEZ, I., LEÓN, M., Labeling of humanized MAb h-R3 with ⁹⁰Y, *World J. Nucl. Med.* 1 (2002)s186 (abst.).

[16] COLIVA, A., ZACCHETTI, A., LUISON, E., TOMASSETTI, A., BONGARZONE, I., SEREGNI, E., BOMBARDIERI, E., MARTIN F., GIUSSANI A., FIGINI M., CANEVARI S. ⁹⁰Y Labeling of monoclonal antibody MOv18 and preclinical validation for radioimmunotherapy of human ovarian carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 54 (2005)1200-1213.

[17] KUKIS, D. L., DENARDO, S. J., DENARDO, G. L., O'DONNELL, R. T., MEARES, C. F., Optimized conditions for chelation of yttrium-90-DOTA immunoconjugates. *J. Nucl. Med.* 39 (1998)2105-2110.

[18] HANCOCK, R. D., MARTELL, A. E., MOTEKAITIS, R. J. Factors affecting stabilities of chelate, macrocyclic and macrobicyclic complexes in solution. *Coord. Chem. Rev.* 133 (1994)39-65.