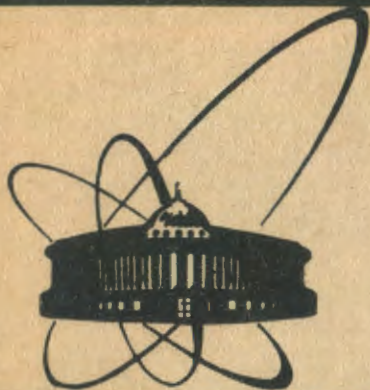


89-190



сообщения
объединенного
института
ядерных
исследований
Дубна

Н 82

P6-89-190

Ю. В. Норсеев, Н. Л. Шмакова

ВВЕДЕНИЕ АСТАТА
В МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

1989

С тех пор как была разработана методика получения клеточных гибридом, способных "in vitro" синтезировать антитела заданной специфичности [1], получены моноклональные антитела [МКАТ] к различным видам опухолей и показана перспективность их использования для иммунодиагностики и иммунотерапии опухолей [1,2].

В последнее время особое внимание обращается на возможность использования МКАТ для целенаправленной доставки в опухоль радиоактивных изотопов в целях радиоиммулокализации [3,4] и радиоиммунотерапии [5] опухолей.

Применение меченных радиоактивными изотопами МКАТ - комплексная проблема, включающая в себя клинические, иммунологические, радиобиологические, радиохимические аспекты. Результативность метода зависит от многих факторов: от используемого носителя (антител), от применяемого в качестве метки радионуклида, от доступности и радиочувствительности мишени (опухолевых клеток), на которую направлен комплекс антитело - радионуклид.

Основная задача метода как при радиоиммунодиагностике, так и при радиоиммунотерапии состоит в том, чтобы достигнуть аккумуляции в опухоли максимального количества меченых антител при минимальном их накоплении в нормальных тканях. Несмотря на то, что при использовании в качестве носителя радиоактивного изотопа МКАТ радиационная нагрузка на нормальные ткани в 2-3 раза ниже, чем при применении поликлональных антител [6,7], радиотоксичность для нормальных тканей является основным фактором, ограничивающим практическое применение меченых МКАТ.

Использование МКАТ в значительной мере осложняется наличием в крови большого количества опухолевых антигенов, реагирующих с мечеными антителами, а следовательно, связанной с этим проблемой очистки крови от циркулирующих в ней антигенов и меченых МКАТ [8,9].

Тем не менее различие в концентрации радионуклидов между опухолью и нормальными тканями, достигаемое с помощью МКАТ и обусловленное главным образом быстрым естественным выведением МКАТ из нормальных тканей по сравнению с опухолями [10], свидетельствует о возможности клинического применения меченых МКАТ [11,12]. Указанные проблемы и

ограничения, возникающие при использовании меченых МКАТ, относятся как к радиоиммунолокализации, так и радиоиммунотерапии. При радиоиммунотерапии, однако, целью является доставка с помощью МКАТ к диссеминированным опухолевым клеткам радиоактивности, достаточной для их стерилизации.

Преимущество радиоиммунотерапии перед иммунотерапией состоит в том, что опухолевые клетки со слабо выраженной антигенной детерминантой или вообще без нее могут тем не менее стерилизоваться "пересекающей" радиацией от соседних клеток, имеющих на поверхности большое число детерминантных групп и связывающихся с мечеными антителами. Эффект "пересекающей" радиации, таким образом, как бы нивелирует отрицательное влияние антигенной гетерогенности опухолевых клеток на эффективность иммунотерапии [13-14].

Наиболее целесообразным способом решения этой проблемы является использование для доставки антителами радионуклидов с высокой цитотоксической эффективностью, а именно альфа-излучателей. Высокая биологическая эффективность альфа-частиц обусловлена отсутствием в облученных клетках репарации разрывов ДНК, а также одинаковой поражаемостью гипоксических и оксигенированных клеток опухоли.

В клинической практике до настоящего времени были использованы лишь МКАТ, меченные иодом-131 [7,8,15], что, вероятно, можно объяснить относительной дешевизной радионуклида и хорошо разработанной методикой введения метки в молекулу иммуноглобулина.

Количество альфа-излучателей, пригодных для целей радиоиммунотерапии, ограничено.

По своим ядерным свойствам изотоп астата-211 может оказаться перспективным радиотерапевтическим препаратом. Это чистый альфа-излучатель с периодом полураспада 7,2 часа. Распад его на 41% совершается путем испускания альфа-частиц с энергией 5,9 МэВ и на 59% через электронный захват. В первом случае дочерний висмут-207 имеет достаточно длинный период полураспада - 38 лет, и радиационная нагрузка от его распада будет на 10 порядков меньше, чем от самого астата. Во-втором - у полония-211 происходит 100% альфа-распад (энергия альфа-частиц 7,4 МэВ) с периодом полураспада 0,52 с, приводя к стабильному свинцу-207. Таким образом, каждый акт распада изотопа астата-211 сопровождается испусканием альфа-частиц со средней энергией 6,8 МэВ. Длина их пробега в биологических тканях составляет всего 60 микрон [16]. Таким образом, ионизация происходит в малом

объеме, при локализации астата в опухоли окружающие ткани не будут страдать от его радиоизлучения. Мощность дозы облучения в 1 грамме биологической ткани от источника астата-211 в 1 микроюри при его равномерном распределении составляет около 4 миллирад/с [17]. Поглощенная доза в ткани после полного распада 1 микроюри астата-211 - около 150 рад [18].

По биохимическим свойствам астат подобен иоду и, как представитель галогенов, может быть легко введен в различные органические молекулы с образованием прочной химической связи с углеродом. Нами было установлено [19], что энергия разрыва химической связи углерод - астат в астатбензоле равна (181 ± 9) КДж/моль и незначительно меняется в зависимости от присутствия других заместителей в ароматическом кольце [20].

Методы, разработанные для иодирования протеинов, оказались мало-пригодными для астата, поскольку окислители, переводящие иод в активный электрофильный агент, не были достаточно эффективными применительно к астату [21]. Электрофильное астатирование протеинов осуществлено путем электроокисления астата при электролизе раствора астата в фосфатном буфере ($pH=7,4$), содержащем протеины [22]. Успешным было электрофильное астатирование протеинов при окислении астата (с носителем) в нейтральной или слабощелочной среде перекисью водорода [22].

Другой подход к решению проблемы введения астата в биомолекулы - это использование двустадийного метода. Вначале синтезируют астаткарбоную кислоту (или ее производную), затем присоединяют ее к протеину путем конденсации карбоксильной группы кислоты и аминной группы биомолекулы [23-25]. Чаще всего в качестве промежуточного продукта на первой стадии используют параастатбензойную кислоту, синтезируя ее известными в органической химии методами [23, 24], иногда используют функциональные производные астатбензойной кислоты [26].

В данной работе была поставлена задача упростить процесс введения астата в биомолекулу, используя его большую склонность к электрофильному замещению и присоединению [27, 28].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Астат-211 получали генераторным методом из радона-211 ($T_{1/2}=14,6ч$), образующегося в ядерных реакциях глубокого расщепления при облучении

тория протонами с энергией 660 МэВ на α -зонотроне Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ. При сжигании ториевой мишени в токе воздуха радон вместе с другими радиоактивными благородными газами задерживался на активированном угле, охлаждаемом до -95°C . Через 10-12 часов, когда короткоживущие изотопы радона распались, оставшийся радон-211 отделяли от легких радиоактивных благородных газов газо-хроматографическим методом на колонке с молекулярными ситами [29]. От газа-носителя - гелия и других возможных примесей радон-211 очищали окончательно в вакуумной системе. В ней же его переносили в ампулки, заполненные примерно на 90% дважды перегнанной водой или 0,1 М раствором хлорной кислоты. Ампулки запаивали. Через 20 часов их вскрывали и удаляли оставшийся радон нагреванием на водяной бане в течение 15-20 минут. Раствор содержал моноизотопный астат-211 в количестве до 0,5 мкКи.

Моноклональные антитела к раково-эмбриональному антигену типа Anty-C4, относящиеся к классу IgG, были получены из Онкологического центра АМН СССР уже очищенными методом ионообменной хроматографии. Рабочие растворы антител концентрацией 1мкг/мл в 0,02 М Na_2HPO_4 готовились непосредственно перед экспериментом.

Полидекстрановый гель типа Сефадекс G-25 для хроматографической очистки МКАТ, меченных астагом, предварительно замачивали для набухания в 0,02 М растворе фосфата натрия. Через 3 часа его дегазировали в течение 1 часа под водоструйным насосом и переносили в колонку длиной 20 мм и внутренним диаметром 7мм. На подготовленном таким образом Сефадексе G-25 проводили работу не более 2 недель, после чего готовили новую колонку. К выходу из колонки присоединялась тефлоновая трубочка с внутренним диаметром 0,3 мм. Свернутая в плоскую спираль, она проходила под сцинтилляционным счетчиком измерителя радиоактивности, сигнал от которого поступал на самописец, где и записывалась хроматограмма разделения и очистки радиоактивных продуктов. В качестве элюента использовали 0,1 М раствор Na_2HPO_4 , следующий через колонку со скоростью 0,33 мл/мин.

Все водные растворы препаратов и реагентов готовили на дважды перегнанной воде. Хлорную кислоту очищали двойной перегонкой.

Обычно реакции электрофильного замещения астагом проводят при повышенных температурах (более 100°C) и в кислых средах с $\text{pH} > 2$ [27, 30]. Эти условия неприемлемы для моноклональных антител.

Необходимо было, не разрушая биомолекулу, сохранить электрофильную активность астата. Известно, что растворы с рН, близким к 6, не вызывают структурного изменения МКАТ, и аstat в таких средах сохраняет электрофильную способность [28].

Предварительные эксперименты по нахождению условий введения астата в МКАТ проводили с иодом-131. Было подобрано соотношение растворов реагирующих веществ с таким учетом, чтобы окончательная кислотность реакционной среды стала близкой к нейтральной. Найдено, что добавление к препарату астата в растворе 0,1 М хлорной кислоты, равного в миллимольном соотношении раствора фосфата натрия, создает среду с рН=6,1. Избыточное количество буферного раствора Na_2HPO_4 , в миллимольном соотношении в 1,5 раза приближает рН к 6,8. Присутствие в реакционной среде персульфата натрия резко подавляет вхождение астата в биомолекулу, в то же время перекись водорода несколько увеличивает степень астатирования.

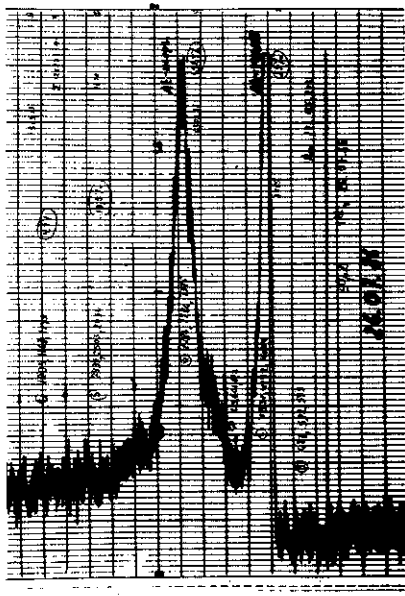
На основании поисковых исследований была выбрана следующая схема электрофильного астатирования моноклональных антител.

К 60 микролитрам раствора астата в 0,1 М хлорной кислоте добавляли 10 микролитров 0,05 М раствора перекиси водорода, 50 микролитров 0,1 М Na_2HPO_4 . Затем вводили 50 микролитров раствора МКАТ концентрацией 1мкг/мкл в 0,02 М Na_2HPO_4 . Смесь тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 1 час. Реакцию астатирования обрывали добавлением к реакционной смеси 30 микролитров 0,5 М раствора Na_2SO_3 . Для очистки астатированных МКАТ от непрореагировавшего астата смесь вводили в хроматографическую колонку с Сефадексом G-25. Радиохроматограмма продуктов реакции представлена на рисунке. Астатированные моноклональные антитела выходили из колонки почти сразу же после свободного объема колонки в первом пике, во втором - непрореагировавший аstat. Выход продукта - астатированных моноклональных антител - составляет $(30 \pm 2)\%$.

Была проведена оценка прочности связи астата в биомолекуле "in vitro". Для этого фракцию, содержащую астатированные МКАТ, собирали в пробирку, выдерживали при комнатной температуре в

течение 15 часов и вновь вводили на колонку. Хроматограмма в этом случае показала наличие только одного пика. Не связанного с биомолекулой астата не было обнаружено. По радиоактивности в этом пике содержалось ~100% астата, взятого из фракции. Следовательно, астат, введенный в молекулу моноклонального антитела в виде электрофильного агента по изложенной выше методике, достаточно прочно удерживается в ней "in vitro". Стабильность "in vivo" в данной работе не проверялась.

На основании проведенных экспериментов мы не можем сказать, каким путем астат входит в биомолекулу МКАТ (через обмен или присоединение) и связывается ли он с углеродом или же с другим элементом. Для этого необходимы дополнительные исследования, которые намечено провести в будущем.



Радиохроматограмма очистки астированных МКАТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Моноклональные антитела: Гибридомы. Новый уровень биологического анализа. - Под ред. Кеннет Р.Г., - М. Медицина, 1983.
2. Lotze M.T., Rozenberg S.A., "Ca", 1988, 38, N2, p.68.
3. Rogers G.T., Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 1987, 22, N10, p.1127.
4. Ткачева Т.А., Мед. радиология, 1984, N11, с. 67.
5. Cobb L.M., Humm J.L., Br. J. Cancer, 1986, 54, p.863.
6. Ettinger D.S., et.al., Cancer Treat. Rep., 1982, 66, p.289.

7. Larson S.M., et.al., *J. Clin. Invest.*, 1983, 72, p.2101.
8. Nadler L.M., et.al., *J. Immunol.*, 1983, 130, p.1462.
9. Rogers G.T., et.al., *Brit. J. Cancer*, 1986, 54, p.156.
10. Klein J.L., et.al., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1985, 11, p.1489.
11. Carrasquillo J.A., et.al., *Cancer Treat. Rep.*, 1984, 68, p.317.
12. Sears H.F., et.al., *Biol. Resp. Modifiers*, 1983, 3, p.138.
13. Foster C.S., et.al., *Virchows Arch (Pathol. Anat.)*, 1982, 394, p.295.
14. Edwards P.A.W., et.al., *J. Cell. Sci.*, 1985, 73, p.321.
15. Pectasides D., et.al., *Br. J. Cancer*, 1986, 53, p.727.
16. Neirinckx R.D., Myburgh J.A., Smit J.A., *Proc. Symp. Develop. Radiopharm. Labelled Compounds*, Vienna, IAEA 1973, Vol.2, p.171-181.
17. Rossler K., Tornau W., Stocklin G., *J. Radioanal. Chem.*, 1974, 21, p.199-209.
18. Persiqehl M., Rossler K., Julich, 1975, KFA, AED-Conf-75-193-078.
19. Вашарош Л., Норсеев Ю.В., Халкин В.А., *ДАН СССР*, 1982, 263, N1, с.119-123.
20. Vasaros L., Norseyev Yu.V., Nhan D.D., Khalkin V.A., Huan N.K., *J. Radioanal. Nucl. Chem. Letters*, 1984, 87, N1, p.31-39.
21. Smit J.A., Myburgh J.A., Neirinckx R.D., *Clin. Exptl.Immunol.*, 1973, 14, p.107.
22. Aaij C., Tschroots W.R.J.M., Lindner L., Feltkamp T.E.W., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 1975, 26, p.25-30.
23. Zalutsky M.R., et.al., *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 1977, 13, p.181.
24. Vaughan A.T.W., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 1979, 30, p.576.
25. Harrison A., Royle L., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 1984, 35, p.1005-1008.
26. Zalutsky M.R., Narula A.S., *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, 1988, 39, N3, p.227-232.
27. Vasaros L., Norseyev Yu.V., Nhan D.D., Khalkin V.A., *Radiochem. Radioanal. Letters*, 1982, 54, n4, p.239-248.
28. Норсеев Ю.В., Вашарош Л., Нян Д.Д., Хуан Н.К., *Радиохимия*, 1987, 29, N4. с.474-477.

29. Колачковски А., Норсеев Ю.В., - Дубна, 1973 /Препринт ОИЯИ:
Р6-6923/.

30. Вашарош Л., Норсеев Ю.В., Халкин В.А., ДАН СССР, 1982, 226, н1,
с.120-122.

Рукопись поступила в издательский отдел
25 марта 1989 года.