

94-104



объединенный  
институт  
ядерных  
исследований  
дубна

P6-94-104

Ш.Милес, Ю.В.Норсеев<sup>1</sup>, З.Сюч, Л.Вашарош\*

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЧЕННЫХ АСТАТОМ  
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Направлено в журнал «Радиохимия»

---

\*Центральный институт физических исследований, Будапешт  
<sup>1</sup>E-mail — [norseev@ljar31.jinr.dubna.su](mailto:norseev@ljar31.jinr.dubna.su)

## ВВЕДЕНИЕ

Моноклональные антитела (МКАТ) обладают уникальной специфической способностью взаимодействия с опухолевыми антигенами, что открывает широкие возможности использования их для диагностики и терапии раковых образований. Эффект уничтожения опухолевых клеток будет усилен при введении в МКАТ радионуклидов, излучающих альфа-частицы. Одним из таких чистых альфа-излучателей является астат-211, имеющий период полураспада 7,2 часа. Этот изотоп на 41% распадается 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 излучения будет на 10 порядков ниже, чем от самого астата. Во втором случае у дочернего полония-211 происходит 100% альфа-распад (энергия альфа-частиц 7,4 МэВ) с периодом полураспада 0,52 секунды, 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 60 микрон [1], следовательно, ионизация осуществляется 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 МкКи при его равномерном распределении составляет около 4 Mr в секунду [2]. Поглощенная доза в ткани после полного распада 1 микрокури астата-211 будет около 150 рад [3].

Астат — представитель галогенов и по своим биохимическим свойствам подобен йоду. Однако используемые для иодирования иммуноглобулинов методы не давали положительных результатов при перенесении их на астат. Соединения, окисляющие йод до электрофильного агента, не способны были перевести астат до легко астатирующей белковые молекулы формы. Астат был переведен в электрофильный агент электроокисления при электролизе раствора астата в фосфатном буфере при  $\text{pH} = 7,4$  [4]. Электролиз проводили в присутствии протеинов, которые сразу же подвергались астатированию. По другому методу электрофильное введение астата в протеины было выполнено при окислении астата в нейтральной или щелочной среде перекисью водорода [4]. Реакция обычно шла в присутствии носителя — йода [5]. В работах [6,7] было показано, что астат в кислой

среде проявляет характер электрофила и сохраняет его в слабокислой среде. Это свойство астата было использовано при введении его в МКАТ [8]. Следует отметить, что хотя прямое астатирование приводило к достаточно высокому вхождению астата в биомолекулы, связь его носила неопределенный характер [9]. Как было установлено [10,11], астат со временем покидает молекулу. Блуждая в организме, такой несвязанный астат вызовет нежелательное облучение окружающих тканей. С успехом были использованы известные в биохимии реакции взаимодействия с биомолекулой специфичных соединений, к которым предварительно присоединялся астат. Обычно в этом случае вначале получают астатпроизводное соединение, содержащее как карбоксильные, так и аминные группы (чаще функциональные производные астатбензойной кислоты), далее астатпроизводное соединение привязывают к биомолекуле [12-15]. Применение более сложных астаторганических соединений, например N-суксинимидил-3-астатбензоата [16-18], позволило получать астатированные биомолекулы с прочно связанным в них астатом, который не покидал их «in vivo». Исходное астаторганическое соединение было получено путем замещения группы станита в N-суксинимидил-3(три-н-бутилстанит)-бензоата астатом, окисленным t-бутилгидроксипероксидом.

Известно, что астат, окисленный до катионной формы, по свойствам похож на металл и способен давать комплексные соединения с рядом хелатных комплексообразователей [19-20], в том числе и с диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТПА), которая образует прочные комплексы с металлами [21]. Будучи присоединенной к белковой молекуле, она сохраняет способность комплексообразования с металлами [22]. Известно, что ДТПА используется для получения радиодиагностических препаратов — моноклональных антител, меченных цинком-65 [22] и индием-111 [23].

Поэтому было интересно исследовать возможность введения астата в иммуноглобулины, используя его комплекс с ДТПА.

Данная работа посвящена разработке метода и нахождению оптимальных условий введения астата в поликлональные и моноклональные антитела через его комплекс с диэтилентриаминпентауксусной кислотой.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** Моноклональные антитела — РЯ<sub>1</sub> к антигену рака яичника, относящиеся к классу IgG, были получены из Онкологического центра АМН СССР. Поликлональные антитела IgG и IgM (кролик) наработаны и очищены в Медицинском университете г.Дебрецена (Венгрия). Рабочие растворы антител концентрацией 1 мг/мл готовили непосредственно перед экспериментом. Также использовали свежеприготовленные растворы

ДТПА («Мерк», сверхчистый), хлорида натрия (ч.д.а.) и персульфата натрия (ч.д.а.). Все водные растворы препаратов и реагентов готовили на дважды перегнанной воде и, если было необходимо, доводили их кислотность до близкой к нейтральной (рН не ниже 6,2 и не выше 7,2).

Астат-211 получали генераторным методом из радона-211 ( $T_{1/2} = 14,6$  часа), образующегося в ядерных реакциях глубокого расщепления при облучении тория протонами с энергией 660 МэВ на фазотроне Лаборатории ядерных проблем ОИЯИ [7]. На последней стадии очистки астат со стенок ампулы переводили путем дистилляции в раствор 0,05 моль/л  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , содержащий ДТПА концентрацией  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л. Дистилляцию проводили в присутствии серебра (в виде фольги толщиной 5 микрон и размером поверхности  $3 \times 10 \text{ мм}^2$ ), на котором адсорбировался дочерний полоний.

*Синтез комплекса AtДТПА и присоединение At к антителам.* После перегонки астата в раствор окислителя, содержащий ДТПА и имеющий общий объем не более 20 микролитров, смесь нагревали на водяной бане при температуре не выше 60°C в течение 5 минут, затем охлаждали до < 37°C и добавили раствор антител. При постоянном перемешивании данную смесь выдерживали определенное время при температуре (37,0 ± 0,2)°C.

*Анализ.* Идентификацию полученных соединений проводили на полидекстрановом геле Сефадекс G-25. Гель предварительно, не менее, чем за 3 часа, замачивали в 0,1 моль/л растворе хлорида натрия, затем дегазировали в течение 1 часа, используя водоструйный насос, и переносили в колонку длиной 300 мм и внутренним диаметром 5 мм. Приготовленный таким образом Сефадекс G-25 использовали не более недели, после чего готовили новую колонку. Элюентом служил 0,1 моль/л раствор хлорида натрия, который проходил через колонку со скоростью 0,5 мл/мин. Детектирование выходящих из колонки продуктов проводили сцинтилляционным счетчиком измерителя радиоактивности. Сигнал от последнего передавался на персональный компьютер COMMODORE C-64, на котором проводилась обработка хроматографических данных [24].

Моноклональные антитела, меченные астатом, выходили из колонки сразу же после прохождения ее свободного объема, причем 1 мл элюата содержал более 90% соединения. Комплекс астата с ДТПА вымывался при выбранных условиях во фракции, приходящейся на 4-5 мл за вычетом свободного объема колонки. Несвязанный астат оставался на колонке. Для определения химического выхода реакции введения астата в антитела, фракцию, содержащую астатированные биомолекулы, собирали в пробирку и измеряли ее радиоактивность на сцинтилляционном счетчике, имеющем кристалл «с колодцем». В идентичных условиях изме-

ряли радиоактивность исходного вводимого в колонку раствора. Сравнивая радиоактивность фракции, содержащей антитела, с радиоактивностью в исходной реакционной смеси, рассчитывали долю астата, присоединившегося к биомолекуле — химический выход реакции астатирования антитела в процентах.

Определение устойчивости и дополнительную идентификацию получаемых соединений (как комплекса астата с ДТПА, так и антител с введенным в них астатом) проводили на электромиграционной установке [25], управляемой персональным компьютером типа IBM PC-XT/AT [26]. При градиенте напряжения 10 В/см и температуре 25°C. По электрофореграммам определяли подвижность получаемых соединений, делали оценку химического выхода реакции комплексобразования астата с ДТПА и взаимодействия этого комплекса с антителами. В качестве электролита использовали раствор, состоящий из  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л ДТПА и  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л персульфата натрия с pH ~ 6 и постоянной ионной силой ( $\mu = 0,01$ ), стабилизированной добавлением  $\text{NaClO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$  и  $\text{NaOH}$ .

Иммунную активность меченных астатом моноклональных антител определяли с помощью конкурентного иммуноферментного анализа в ячейках микротитровочных плит стандартным методом [27].

Приводимые на рисунках величины являются среднеарифметическими из не менее чем трех независимых экспериментов, в которых хроматографический и электромиграционный анализы проводились обычно 2—3 раза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический анализ и эксперименты по электромиграции показали, что астат более чем на 90% связывается в прочный комплекс с ДТПА. С помощью этого комплекса астат вводится в антитела. Процесс введения протекает в водной среде в мягких условиях — pH ~ 6—7, температура 37°C. Было обнаружено, что в этих условиях за 10 минут происходит максимальное присоединение астата к моноклональным антителам типа РЯ<sub>1</sub>. Для первой партии полученных антител выход меченных астатом МКАТ типа РЯ<sub>1</sub> достигал  $(3 \pm 12)\%$  от исходного астата, для второй —  $(72 \pm 3)\%$ . Вероятно, это связано с более тщательной очисткой МКАТ во второй партии. Хроматографические данные указывают, что оставшая часть астата находится в виде его комплекса с ДТПА. Таким образом, ДТПА обеспечивает возможность селективного связывания астата с антителом.

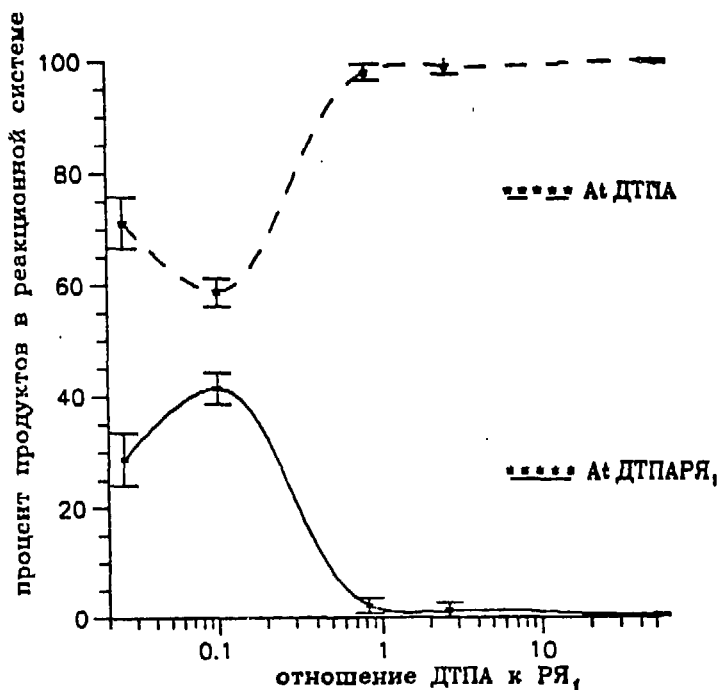


Рис. 1. Зависимость выхода меченных астатом моноклональных антител типа РЯ<sub>1</sub> и количества свободного комплекса АtДТПА в реакционной системе комплекс — антитело от молярного соотношения ДТПА/РЯ<sub>1</sub>.

Как показал иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, меченные астатом, не теряют своей иммунной активности во время синтеза и сохраняют ее без изменения через 20 часов выдержки при комнатной температуре.

Количество присоединяемого к МКАТ астата зависит от молярного соотношения комплексообразователя — ДТПА и антитела — РЯ<sub>1</sub> (рис.1). Отсюда видно, что наибольший выход меченных астатом антител наблюдается при десятикратном избытке МКАТ.

Природа антитела влияет на количество вошедшего в них астата. Так, в идентичных условиях в поликлональное антитело типа IgG максимально входит  $(73 \pm 2)\%$  астата, в то время как в IgM —  $(33 \pm 2)\%$ . Вероятно, реакционные группы IgM экранируются инертными частями этой огромной биомолекулы (молекулярная масса IgM примерно в 6 раз больше, чем масса IgG). Для поликлональных антител также наблюдается зависимость астатирования биомолекулы от молярного соотношения комплексообразова-

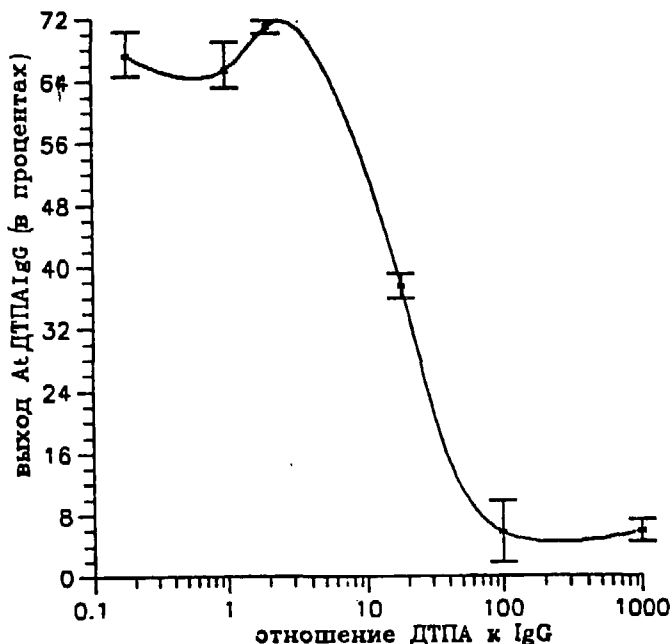


Рис.2. Процент астата, присоединенного к поликлональным антителам типа IgG, в зависимости от молярного соотношения ДТПА/IgG.

теля и поликлонального антитела (рис.2 и 3). Максимальный выход для IgM приходится на соотношение 1:2. Для IgG в широком интервале соотношений (от 1:10 до 10:1) наблюдается большое вхождение астата в антитела. И только при избытке ДТПА более, чем в 20 раз, появляется не вступающий в реакцию комплекс.

Температура реакции в интервале от 0 до 37°C мало сказывается на количестве присоединившегося к антителам астата.

На рис.4 показана кинетическая зависимость количества введенного через комплекс At-ДТПА астата в антитела типа IgG и IgM при температуре 37°C. Подобный ход зависимости наблюдается и для моноклональных антител РЯ<sub>1</sub>. Видно, что проводить реакцию дольше 20 минут нецелесообразно. Медленное вхождение астата в наиболее тяжелую (и большую) молекулу IgM связано, вероятно, в первую очередь с геометрическим фактором, а также с переориентацией астата на другие реакционные центры биомолекулы, находящиеся в труднодоступных местах.

Рис.3. Зависимость выхода меченных астатом поликлональных антител типа IgG (а) и IgM (б) и количества свободного комплекса АтДТПА в реакционной системе комплекс — антитело от молярного соотношения ДТПА/антитело.

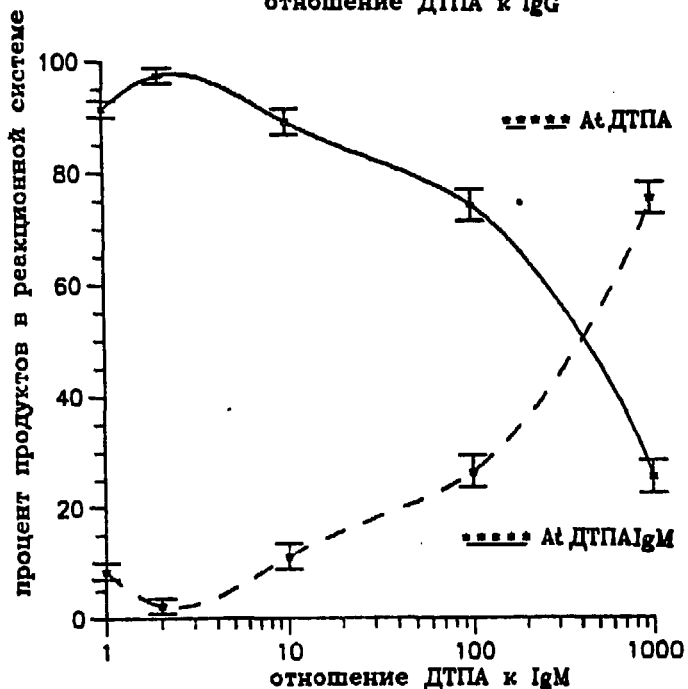
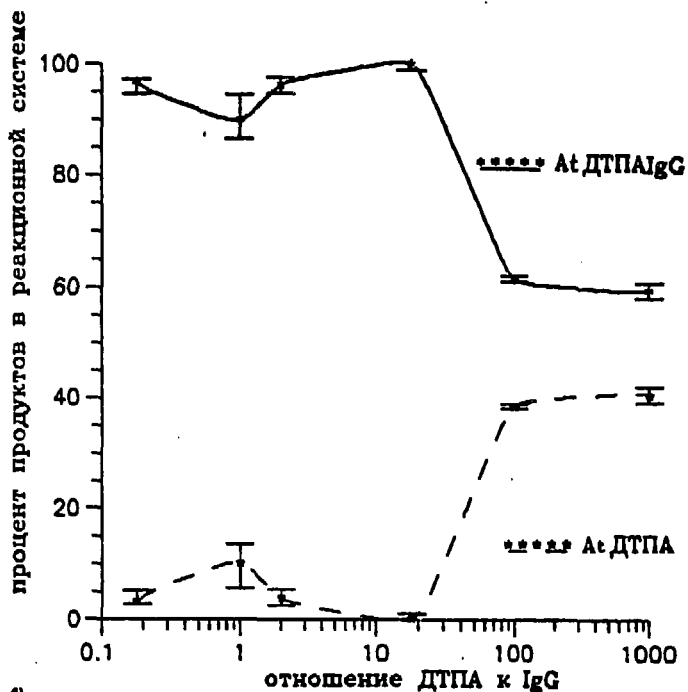
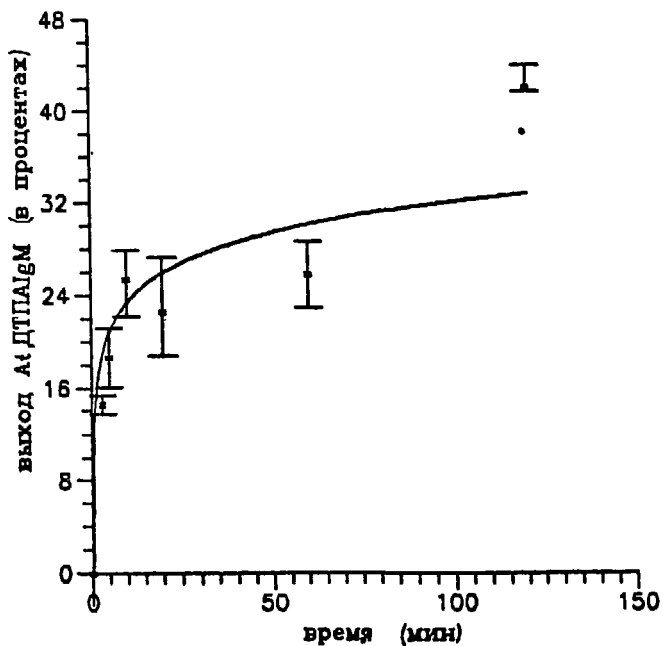
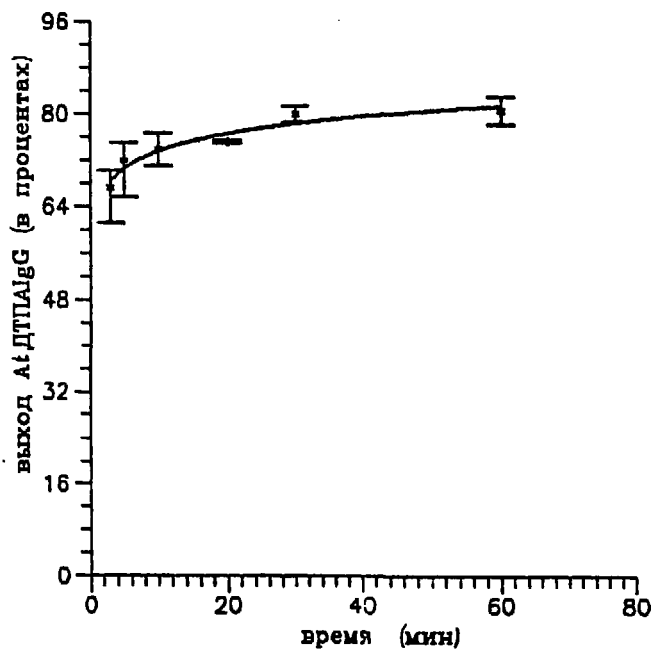




Рис.4. Выход меченых астатом поликлональных антител типа IgG (а) и IgM (б) от времени реакции.



Исходя из найденных закономерностей была выбрана следующая методика введения астата в моноклональные антитела.

Астат перегоняли в  $5 \cdot 10^{-4}$  моль/л раствор ДТПА, содержащий в качестве окислителя персульфат натрия концентрацией 0,05 моль/л. Общий объем смеси, имеющей pH ~ 6-7, не превышал 10 микролитров. После перегонки смесь нагревали на водяной бане при 60°C в течение 5 минут, затем охлаждали до комнатной температуры. К раствору комплекса астата с ДТПА добавляли 150-200 микролитров раствора МКАТ (РЯ<sub>1</sub>) концентрацией 1 мг/мл. При постоянном перемешивании данную смесь выдерживали в течение 10 минут при  $37,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$ . Меченные астатом МКАТ очищали на колонке с Сефадекс G-25. Полученные таким образом астатированные моноклональные антитела в количестве 0,15-0,2 мг с удельной активностью ~0,2 ГБк/мг находились в 1 мл 0,1 моль/л раствора хлорида натрия. Количество МКАТ и их удельную активность можно варьировать.

Астат достаточно прочно удерживается в биомолекуле «in vitro». Это отражают результаты повторной очистки астатированных антител. Так, очищенные на колонке с Сефадекс G-25 антитела, меченные астатом, выдерживали при температуре 37°C в течение 12 часов и вновь вводили на колонку. Радиохроматограмма показала, что астат удерживался в антителах, и его содержание в них оставалось почти прежним —  $(93 \pm 2)\%$ .

Прочность удерживания астата в биомолекуле была дополнительно проверена и другим методом. Известно, что тиомочевина связывает астат в очень прочный комплекс, замещая лиганд почти в любых комплексах астата [28]. Тем не менее в электролите, содержащем  $10^{-3}$  моль/л тиомочевины и 0,01 моль/л перхлората натрия, при описанных выше условиях электромиграции не наблюдалось выхода астата из биомолекулы.

Однако следует отметить, что электрическое поле отрицательно влияет на прочность связи астата в биомолекуле. Так, пятичасовое пребывание астатированных антител в капилляре для электромиграции в свободном электролите (в отсутствие тиомочевины) показало, что около 20% астата начинает покидать зону ввода (антитела при выбранных условиях проведения электромиграции остаются на месте). Скорость миграции уходящей анионной формы астата значительно ниже скорости комплекса At-ДТПА. Это могут быть фрагменты антител или биомолекулы меньших размеров, присутствующие в исходных антителах.

В данной работе мы не ставили перед собой задачу изучения механизма проникновения астата в биомолекулу. Тем не менее можно предположить, что поскольку в комплексном соединении с ДТПА астат находится в катионной форме, то при взаимодействии с МКАТ он покидает комплексобразователь и присоединяется к активным центрам биомолекулы, со-

храняясь в форме электрофильного агента. Не исключено, что он связывается с тиогруппами биомолекулы [28]. Однако определение механизма вхождения астата в МКАТ в предлагаемых нами условиях требует дополнительных исследований.

В заключение авторы приносят благодарность В.А.Халкину за интерес к работе; Г.А.Ткачевой, Н.Л.Шмаковой и А.А.Вайнсону за предоставленные МКАТ и помощь в определении иммунно-ферментной активности меченных астатом антител; Пей Ен Сун и И.Петржелку за техническую помощь в проведении хроматографического анализа полученных соединений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Neirinckx R.D., Myburrgh J.A., Smit J.A. — Proc. Symp. Develop. Radiopharm. Labelled, Compounds, Vienna, IAEA 1973, vol.2, p.171.
2. Rossler K., Tornau W., Stocklin G. — J.Radioanal.Chem., 1974, 21, p.199.
3. Persigehl M., Rossler K. — Julich, 1975, KFA, AED-Conf-75-193-078.
4. Aaij C. et.al. — Int.J.Appl.Radiat. Isotopes, 1975, 26, p.25.
5. Pillai K.M.R. et al. — J. Labelled Comp.Radiopharm., 1987, 24, No.9, p.1117.
6. Vasaros L. et al. — Radiochem.Radioanal. Letters, 1982, 54, No.4, p.239.
7. Норсеев Ю.В. и др. — Радиохимия, 1987, 29, №4, с.474.
8. Норсеев Ю.В., Шмакова Н.Л. — Препринт ОИЯИ Р6-89-190, Дубна, 1989.
9. Visser G.W.M., Diemer E.L., Kaspersen F.M. — Int.J.Appl. Radiation Isotopes, 1981, 32, p.905.
10. Vaughan A.T.M., Fremlin J.H. — Int.J.Nucl.Med.Biol., 1978, 5, p.229.
11. Visser G.W.M., Kaspersen F.M. — Int.J.Nucl.Med.Biol., 1980, 7, p.79.
12. Zalutsky M.R., Friedman A.M. — J. Labelled Compd.Radiopharm., 1977, 13, p.181.
13. Vaughan A.T.M., Bateman W.J., Fisher D.R. — Int.J. Radiation Oncology Biol.Phys., 1982, 8, No.11, p.1943.
14. Harrison A., Royle L. — Int.J.Appl.Radiat. Isotopes, 1984, 35, p.1005.
15. Yi Changhou et al. — J.Radional.Nucl.Chem., Articles, 1989, 129, No.2, p.377.
16. Zalutsky M.R., Narula A.S. — Int.J.Radiat. Isotopes, 1988, 39, No.3, p.227.
17. Narula A.S., Zalutsky M.R. — Radiochim. Acta, 1989, 47, p.131.
18. Zalutsky M.R. et al. — Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1989, 86, p.7149.
19. Milesz S. et al. — J.Radioanal.Nucl.Chem., Letters, 1988, 127, No.3, p.193.
20. Milesz S. et al. — J.Radioanal.Nucl.Chem., Letters, 1989, 137, No.5, p.365.

21. Keeling A.A., Bradwell A.R. — J.Label.Comp. and Radiopharm., 1987, 24, No.1, p.83.
22. Hnatowich D.J. et al. — Science, 1983, 220, p.613.
23. Reilly R.M., Ege G.N. J.Label.Comp. and Radiopharm., 1987, 24, No.5, p.541.
24. Сюч З., Илиш З., Молнар Й. — Препринт ОИЯИ Р10-89-223, Дубна, 1989.
25. Milanov M. et al. — J.Radioanal.Nucl.Chem.,Articles, 1984, 82, No.1, p.101.
26. Milesz S. et al. — J.Radioanal.Nucl.Chem., Letters, 1989, 135, No.4, p.231.
27. Clark R., Engvall E. — In: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Theoretical and Practical Aspects. Enzyme-Immunoassay (E.T.Maggio ed.). Boca Raton, Florida, 1981, p.167.
28. Visser G.W.M. — Ph.D. Thesis, University of Amsterdam, ISBN 90 64880050, 1982.

Рукопись поступила в издательский отдел  
28 марта 1994 года.