

УДК 60+615.84

МЕТОД ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ ^{131}I С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ ДЛЯ РАДИОИММУНОДИАГНОСТИКИ И РАДИОИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

Анохин Ю.Н.

Обнинский институт атомной энергетики- филиал федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ", г.Обнинск, Россия, e-mail-Yuri@iate.obninsk.ru

Цель исследования. Предложить метод увеличения эффективности связывания изотопа ^{131}I с противоопухолевыми моноклональными антителами (монАТ) для радионуклидной диагностики и терапии опухолей гематогенной природы. Материалы и методы. В работе использованы монАТ российского производства ИКО-1 против дифференцировочных антигенов номенклатуры Ia, которые синтезируются клетками эритро- и В-лимфолейкозов. Связывание монАТ с радионуклидом проводили в присутствии препаратов Iodogen или хлорамина-Т. Результаты и их обсуждение. Эффективность связывания радионуклида ^{131}I с монАТ в присутствии окислителя Iodogen составляла 86,5% от введенной в смесь радиоактивности, тогда как аналогичный показатель для хлорамина-Т был в 2 раза меньшим (43%). Выводы. 1) С помощью препарата Iodogen возможно более эффективное связывание радионуклида ^{131}I с монАТ, чем при использовании окислителя хлорамина-Т. 2) Использование агента "Iodogen" позволило создать комплекс моноклональных антител с радионуклидом ^{131}I с лучшими характеристиками накопления в опухолевом очаге в сравнении с аналогичным комплексом, полученным по методу "хлорамин-Т".

Ключевые слова Iodogen, моноклональные антитела, радиоиммунодиагностика, радио-иммунотерапия, опухоли, радионуклид, направленный транспорт, связывание

METHOD OF INCREASING THE EFFICIENCY OF BINDING ^{131}I WITH MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER RADIOIMMUNODIAGNOSIS AND RADIOIMMUNOTHERAPY

Anokhin Y.N.

Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering, National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia, e-mail-Yuri@iate.obninsk.ru

The purpose of the study. Propose a method of increasing the efficiency of radionuclide ^{131}I binding to antitumor monoclonal antibodies (mAb) for radionuclide diagnosis and therapy of hematogenous tumors. Materials and methods. MAb ICO -1 type against differentiation Ia-antigens , which are synthesized by cells of the erythro -and B- lymphocytic leukemia . MAb binding to the radionuclide was performed in the presence of drugs Iodogen or chloramine -T. Results .Effectiveness binding radionuclide ^{131}I with mAb in the presence of an oxidant Iodogen was 86.5 % of the administered radioactivity in the mixture , whereas for chloramine -T it was 2 times lower (43%). . Conclusions. 1) Agent Iodogen served more efficient binding of the radionuclide ^{131}I with mAb than oxidant chloramine - T. 2) Using the Agent "Iodogen" allowed to create a set of monoclonal antibodies with a radionuclide ^{131}I with the best characteristics of accumulation in the tumor tissue compared with the same complex prepared according to the method " chloramine -T ."

Keywords: Iodogen, monoclonal antibodies, radio immunodiagnostics, radio immunotherapy, tumors, the radionuclide, the directed transport, binding

Введение

В последние 15-20 лет в развитых странах интенсивно внедряется направление лечения онкологических заболеваний с использованием меченых антител –радиоиммунотерапия (далее-РИТ). В клинической практике в развитых странах с успехом используются несколько типов радиофармпрепаратов (далее РФП) на основе противоопухолевых моноклональных антител (далее-монАТ)[8,11]. Терапевтическая эффективность этого нового класса РФП во многих случаях очень высока и обусловлена

целенаправленной доставкой источника ионизирующего излучения(радионуклида) в опухоль антителами, взаимодействующими с мишеневыми антигенами на клетках опухоли. Помимо этого, сами антитела могут обладать цитотоксическим действием на опухолевые клетки. Сейчас уже широко используется в научной литературе термин "таргетная терапия" для обозначения особого типа лечебного действия препаратов, созданных на основе антител, их фрагментов, пептидов[8,10,11]. Тем самым подчеркивается целенаправленный, "адресный"

транспорт и взаимодействие введенного(внутривенно или эндо-лимфатически) во внутреннюю среду препарата с мишеневыми антигенами на клетках.

Важным аспектом лечебной эффективности РФП является количество связанного с носителем радиоактивности, обеспечивающее радиотоксический эффект на клетки в патологическом очаге [9,11,12]. МонАТ чрезвычайно избирательны как транспортеры для доставки в опухоль радионуклида. Задача разработчиков радиотерапевтических комплексов на основе монАТ состоит в том, чтобы создать необходимую для достижения лечебного эффекта удельную радиоактивность РФП.

В этом плане хорошим объектом служит давно используемый в клинической и экспериментальной медицине ^{131}I , обладающий приемлемыми параметрами как для диагностических, так и лечебных целей (гамма-излучатель с излучением γ -квантов с энергиями от 0,08 до 0,723 МэВ) - и бета-излучатель (β -частицы с максимальной энергией 0,807 МэВ) со сравнительно коротким временем полураспада - 8,02 сут.). Для его связывания с молекулами антител(иммуноглобулинов) традиционно используется хлорамин-Т (натриевая соль N-хлор-р-толуолсульфонамина). Получаемые комплексы монАТ с ^{131}I (^{131}I -монАТ) обладают удовлетворительными характеристиками для радиоиммунодиагностики [1-6,9]. Однако, необходимость включения в молекулу иммуноглобулина(антитела) высокой дозы радиоактивности для целей радиоиммунотерапии не позволяет с успехом использовать хлорамин-Т, поскольку это приводит к значительной потере иммунореактивности монАТ после процедуры меченения.

В связи с этим, в работе проведено исследование эффективности связывания ^{131}I с монАТ и степень сохранения их иммунореактивности после процедуры радиомеченения с использованием препарата "Iodogen", рекомендовавшим себя как активный окислитель.

Материалы и методы

Процедура радиомеченения монАТ. Моноклональные антитела серии ИКО-1 направлены против Ia-антигенов, экспрессируемых на клетках эритро- и В-лимфоцитов. Их титр в тесте иммунофлуоресценции составлял 1:100. Лиофилизированные с бычьим сывороточным альбумином монАТ растворяли в фосфатном буфере(рН 7,4) до концентрации 10мг/мл. К 2 мл раствора Na^{131}I в фосфатном буфере(37 Мбк/мл) добавляли 2 мл раствора монАТ(1 мг/мл) и вносили в смесь 500 мкг реак-

тива "Iodogen"(1,3,4,6-тетрахлор-3-альфа,6-альфа-дифенилгликоурил)(Pierce,Beijerland, Нидерланды).

В варианте сравнения, к смеси ^{131}I с монАТ добавляли 200 мкг реактива " хлорамин-Т" (натриевая соль N-хлор-р-толуолсульфонамина). В обоих вариантах реакции продолжались 5 мин, после чего блокировались добавлением в смеси 100 мкг аскорбиновой кислоты.

Отделение фракции меченых антител от примесей. Для разделения меченных ^{131}I - монАТ и радиоактивных примесей раствор элюировали методом жидкостной хроматографии на колонках с носителем Sephadex G-15(Pharmacia,Швеция); элюэнтном был фосфатный буфер. Спектр элюируемых фракций монАТ и примесей с радиоактивной меткой определяли на анализаторе "Honeywell"(Великобритания). Помимо этого, анализ чистоты фракции меченных антител проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах с носителем Silufol UV-254.

Тесты для определения иммунной реактивности антител. Иммунологическую реактивность монАТ до и после процедуры связывания с радионуклидом исследовали в цитотоксическом тесте ин витро в присутствии комплемента морской свинки. Клетками-мишенями в тесте служили лимфоциты лимфатических узлов мышей а также клетки опухолевых линий мышинного лимфолейкоза L1210 и гемоцитобластоза La, экспрессирующие мишеневый антиген Ia. Цитотоксичность монАТ определяли по интенсивности выхода красителя "трипанового синего"(Gibco, Шотландия). Опухолевые линии мышинных лейкозов получены из лаборатории экспериментально-биологических моделей РОНЦ РАМН. Суспензии клеток доводили до концентрации 10^8 /мл, вносили в 96-луночные планшеты для культивирования клеток(Costar,США) и добавляли в лунки антитела, меченные ^{131}I по методу "Iodogen" или методом " хлорамин-Т ". В качестве контроля в лунки планшет вносили неиммунные иммуноглобулины(IgG-класса).

После 30 мин культивирования в CO_2 -инкубаторе в лунки добавляли краситель "трипановый синий", через 10 мин клетки отделяли от надосадочной жидкости центрифугированием(1500 об/мин) и определяли интенсивность окрашивания раствора на спектрофотометре, тем самым оценивая жизнеспособность клеток-мишеней по выходу из них красителя.

Исследование биораспределения радиомеченных монАТ в органах животных. В опытах использовали мышей гибридной линии BDF₁(DBA/2 x C57Bl/6)F₁ в возрасте 3 мес, массой около 20 г. За 6 сут до проведения опытов животным вводили внутрибрюшинно по $5 \cdot 10^6$ клеток лимфолейкоза L1210. Для исследований отбирали мышей с солидными формами лейкоза, локализованными на брыжейке кишечника. В день исследования, животным проводили блокаду щитовидной железы питьевым раствором 1,5% иодида калия. После этого им вводили внутривенно по 0,2 мл раствора меченных монАТ с удельной активностью 1 МБк/ мл. В качестве контроля другой группе животных вводили внутривенно 0,2 мл неиммунных мышинных иммуноглобулинов IgG класса, меченных ^{125}I .

Через 24 ч мышей забивали, выделенные органы подвергали радиометрии в дифференциальном режиме для ^{125}I и ^{131}I в колодезном счетчике. Для определения введенной дозы радиоактивности использовали 0,2 мл раствора меченных антител.



Результаты

После процедуры связывания радионуклида с молекулами иммуноглобулинов было проведено отделение (выделение) фракции связавшихся с радиоактивной меткой антител от различных видов примесей и свободного радионуклида. Использовали метод жидкостной хроматографии с подключением счетчика-радиометра для определения уровней радиоактивности различ-

ных элюированных фракций. Результаты этого исследования приведены на рис.1. Они свидетельствуют о том, что основная часть радионуклида связалась с иммуноглобулиновой фракцией (антителами). При этом, в случае использования агента "Iodo-gen" эффективность связывания составила 86,5 %, тогда как при использовании агента "хлорамин-T" она была около 43%. Лишь малая доля радиоактивности приходилась на примесные фракции (около 13%).

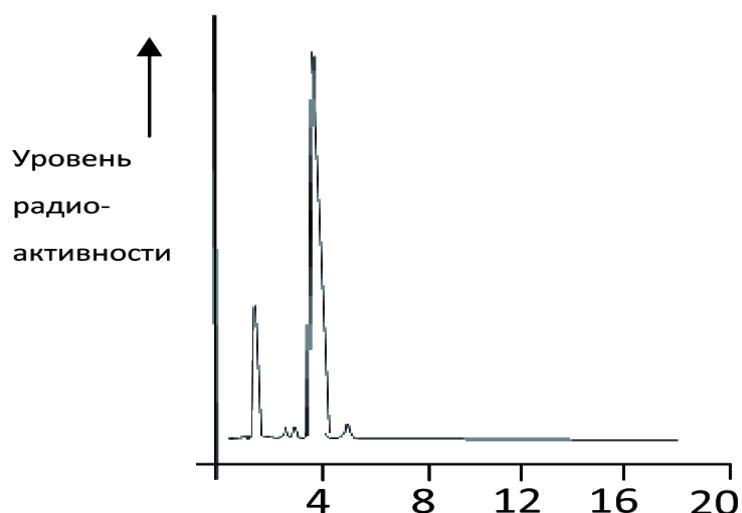


Рис.1. Качественный анализ фракции РФП ^{131}I -ИКО-1 (жидкостная хромато-графия) после процедуры мечения с реагентом "Iodogen"

(Пик 1 – радиоактивные примеси(13%; 1,5 мин); пик 2 – ^{131}I -ИКО-1, (86,5%, 5 мин)

Анализ чистоты фракций меченных антител был подтвержден и методом тонкослойной хроматографии.

Следующим этапом нашей работы был анализ иммунологической реактивности противоопухолевых антител после проведения процедуры радиомечения. Для этого были исследованы иммунологические свойства антител ИКО-1 в тесте комплемент-зависимой клеточной цитотоксичности против различных клеток-мишеней, в том числе и против опухолевых клеток, экспрессирующих в повышенной концентрации Ia-антигены. И снова, тесты были

проведены в сравнительном аспекте для антител, меченных по методу " Iodogen" или методу "хлорамин-Т". Результаты проведенных исследований представлены в табл.1.

Они свидетельствуют о том, что после проведения процедуры радиомечения антитела теряют некоторую долю иммунологической реактивности. При малых разведениях сыворотки(от 1:4 до 1:32) снижение реактивности составляет 20-25%, тогда как при больших разведениях она более выражена(до 75-80 %). По-прежнему, результаты теста более удовлетворительные для реагента "Iodogen" в сравнение с методом "хлорамин-Т".

Таблица 1

Иммунологическая реактивность монАТ ИКО-1 после связывания с радионуклидом ^{131}I

Радиофармпрепарат	Доля погибших клеток-мишеней при различных разведениях монАТ ИКО-1, (% от общего кол-ва клеток)						
	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
1.Немеченые монАТ ИКО-1	53	39	30	26	24	22	16
2. ^{131}I - ИКО-1 (хлорамин-Т)	35	30	23	14	3	3	3
3 ^{131}I -ИКО-1 (Iodogen)	46	39	28	20	12	6	4
4.Неиммунный ^{125}I -IgG	4	3	3	3	4	3	3
5.Неиммунный IgG	3	3	3	3	3	2	3
Результаты цитотоксического комплемент-зависимого теста ин витро против клеток лимфолейкоза L1210							

Следующим этапом было исследование специфичности накопления меченных радионуклидом противоопухолевых антител в органах и тканях лабораторных животных с опухолями в экспериментах *ин vivo*. Схема проведения этой части экспериментов представлена в разделе “Материалы и методы”. Результаты проведенной работы представлены на рис.2. Обращает на себя внимание высокое накопление радио-

фармпрепарата в ткани опухоли в сравнении с любым из исследованных органов. При этом, избирательно накапливались антитела в опухолевом очаге, меченные как по методу “Iodogen”, так и по методу “хлорамин-Т”. Но и здесь, результаты биораспределения радиофармпрепаратов, приготовленных по методу “Iodogen”, были предпочтительнее в сравнении с препаратами метода “хлорамин-Т”.

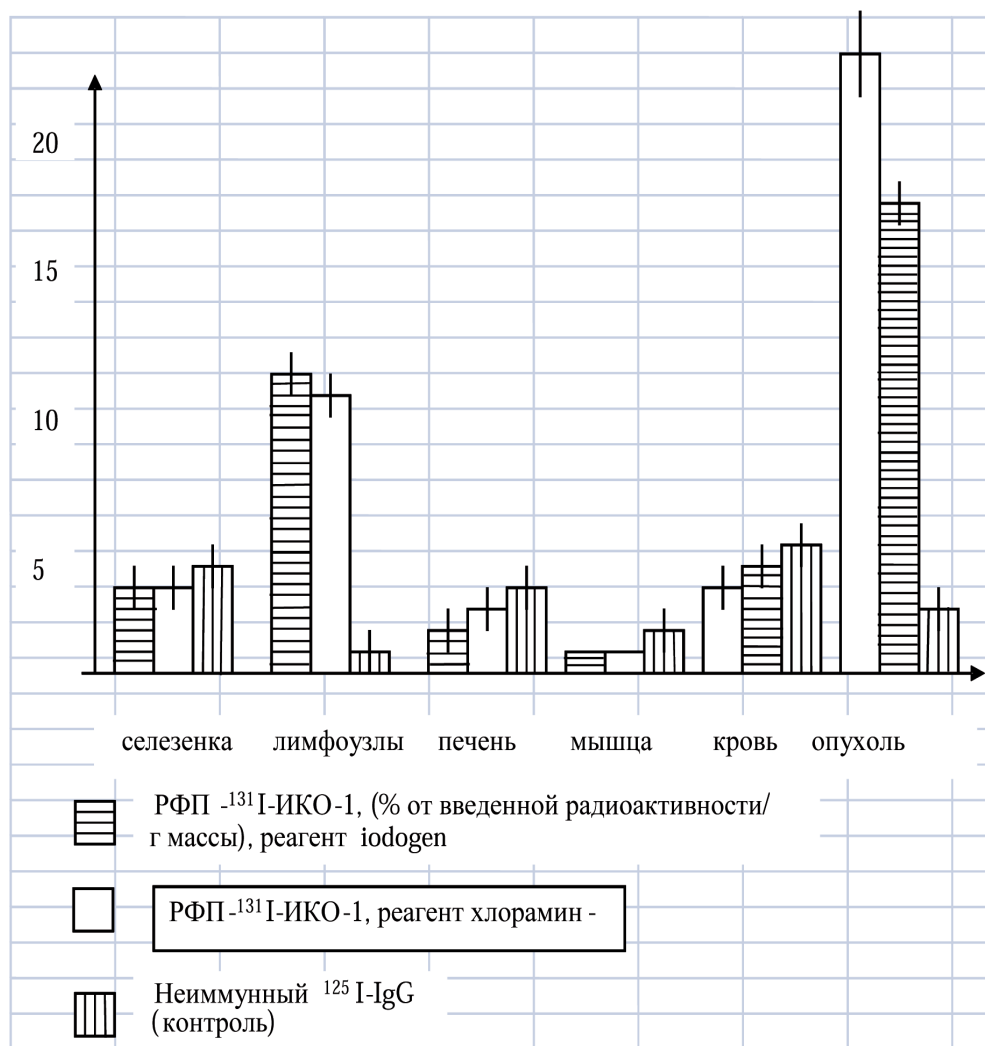


Рис. 2. Накопление меченных радионуклидами моноклональных антител в органах мышей с опухолью. В каждой экспериментальной группе использованы не менее 3 животных ($n=3$). Данные представлены в виде средних величин и средние - квадратичных отклонений от них ($M \pm m$)

Ранее проведенные нами исследования по направленному транспорту радиофармпрепаратов на основе моноклональных противоопухолевых антител в опухолевый очаг показали весьма удовлетворительные результаты.[1-5]. Однако, довольно высокая доля накопления препарата в крови и в печени заставила искать более эффективные

методы связывания радионуклида с антителами с сохранением возможно большей иммунореактивности после радиомечения [7]. Тем самым было возможно снизить неспецифический компонент связывания антител в не-мишеневых органах. Эти поиски привели нас к реагенту “Iodogen”, который оказался не только более активным

окислителем, но и позволял сохранить достаточно высокий уровень иммунореактивности антител после конъюгации с радионуклидом [8,12]. Результаты экспериментов показали снижение неспецифического компонента накопления радиофармпрепарата в таких органах, хотя различия при использовании обоих методов связывания антител с радионуклидом не достоверны.

Выводы

1) С помощью препарата Iodogen возможно более эффективное связывание радионуклида ^{131}I с монАТ, чем при использовании окислителя хлорамина-Т.

2) Иммунологические свойства конъюгата на основе монАТ изменяются после процедуры радиомечения примерно одинаково для обоих окислителей. Такие характеристики являются важными при создании РФП с высокой удельной радиоактивностью для радионуклидной диагностики и радиоиммунотерапии онкологических заболеваний.

3) Использование агента "Iodogen" позволило создать комплекс моноклональных антител с радионуклидом ^{131}I с лучшими характеристиками направленного транспорта в опухолевый очаг в сравнении с аналогичным комплексом, полученным по методу "хлорамин-Т".

Список литературы

1. Анохин Ю.Н., Норец Т.А., Деденков А.Н. Моноклональные антитела в радионуклидной диагностике и терапии опухолевых заболеваний (Обзор) // Мед. радиология, 1985, №6, с. 72-78
2. Анохин Ю.Н. Меченые антитела для радиоизотопной диагностики и терапии опухолевых заболеваний. //1-й Евразийский конгресс по мед. физике, Москва, 2001, №11, с.10
3. Анохин Ю.Н. Меченные радиоизотопами антитела для диагностики и терапии онкологических заболеваний у человека. // Сб. науч. трудов междунар. конф. Биохимия-медицине Махачкала, 2002, с.212-214
4. Анохин Ю.Н. Использование нанотехнологий и наноматериалов для визуализации и терапии злокачественных опухолей. // Тез. докл. науч. сессии НИЯУ МИФИ, Москва, 2010, т.3, стр 67
5. Анохин Ю.Н. Использование нанотехнологий и наноматериалов для визуализации и терапии злокачественных опухолей. // Труды науч. сессии НИЯУ МИФИ-2010 в 6 томах, том 3, Фундамент пробл. науки, М, НИЯУ МИФИ, Москва, 2010, стр.221-224
6. Абакушин Д.Н., Абакушина Е.В., Анохин Ю.Н. Поиск новых мишеней для радиоиммунотерапии онкологических заболеваний Онкология 21-го века : от научных исследований – в клиническую практику. //Мат.8-го Всероссийского съезда онкологов, т. 3, стр.1150, 11-13 сентября 2013, Санкт-Петербург
7. Анохин Ю.Н., Норец Т.А., Петрова Г.А., Ендролов В.В., Трофимова М.В., Новиков В.В. Избирательное накопление меченных ^{131}I -йодом моноклональных антител ИКО-1 в ткани мышинного лимфолейкоза L-1210 // Мед. Радиология. 1988. №1. С. 31-33.
8. Cheson B.D. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas // Blood. 2003. № 101. P. 391-398.
9. Kaminski M.S., Estes J., Zasadny K.R., Francis I.R., Ross C.W., Tuck M., Regan D., Fisher S., Gutierrez J., Kroll S., Stagg R., Tidmarsh G., Wahl R.L. Radioimmunotherapy with iodide (^{131}I) tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience // Blood. 2000. N 96. P. 1259-1266
10. Paganelli G., Chinol M. Radioimmunotherapy: is avidin-biotin pretargeting the preferred choice among pretargeting methods? // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2003. Vol. 30. P. 772-776.
11. van Schaijk F.G., Broekema M., Oosterwijk E., van Eerd J.E.M., McBride B.J., Goldenberg D.M., Corstens F.H.M., Boerman O.C. Residualizing Iodine Markedly Improved Tumor Targeting Using Bispecific Antibody-Based Pretargeting. J. Nucl. Med. 2005; 46:1016-1022
12. Visser G.W., Klok R.P., Klein Gebbink J.B., ter Linden T., van Dongen G.V., Molthoff C.V. Optimal Quality ^{131}I -Monoclonal Antibodies on High-Dose Labeling in a Large Reaction Volume and Temporarily Coating the Antibody with IODO-GEN. J. Nucl. Med. 2001; 42:509-519