

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЧЕНИЯ α -ИЗЛУЧАЮЩИМИ РАДИОНУКЛИДАМИ ^{212}Bi И ^{212}Pb БИОКОНЬЮГАТА, СПЕЦИФИЧНОГО К ОНКОМАРКЕРУ HER-2/neu

П.П. Болдырев, Н.Ю. Кочеткова, М.А. Прошин, Р.Ф. Нуртдинов, А.Н. Семенов
НИЦ “Курчатовский институт”, Москва

Направленная альфа-терапия является альтернативой лечения с минимальными последствиями. Однократный проход альфа-частицы через ядро опухолевой клетки может быть очень токсичным и, как следствие, альфа-частицы могут инактивировать отдельные клетки или небольшие кластеры. Исследовано мечение α -излучающими радионуклидами биохимического соединения (конъюгата) с целью создания субстанции для адресной доставки α -излучающих изотопов к раковой клетке. Для исследований создан генератор радионуклидов ^{212}Bi ($^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$). В результате экспериментов радиохимический выход мечения составил для комплексообразователя ДОТА более 85 %, для ДТПА – более 88 % благодаря использованию фосфатного буфера.

Ключевые слова: радионуклидная терапия, α -излучающие радионуклиды, онкомаркер HER-2/neu, эффективность мечения

Введение

Адресное воздействие на опухолевые ткани – важнейшая проблема современной фундаментальной и практической онкологии. Суть метода адресной или таргетной (от англ. target – мишень) терапии состоит в доставке токсичных препаратов к раковым клеткам с помощью искусственно созданных биохимических соединений (биоконъюгатов), обладающих способностью избирательно соединяться с онкомаркерами на раковой клетке (свойство специфичности).

Одним из наиболее перспективных методов таргетной терапии считается радиоиммунотерапия (РИТ), суть которой состоит в повреждении раковой клетки с помощью короткоживущих α -излучающих радионуклидов (α -эмиттеров), прикрепленных к специфическим конъюгатам. В качестве α -эмиттеров в РИТ могут использоваться ^{149}Tb ($T_{1/2}=4,12$ ч), ^{212}Bi ($T_{1/2}=60$ мин), ^{213}Bi (46 мин), ^{212}Pb (10 ч), ^{225}Ac (10 сут) и некоторые другие. α -частицы

обладают высокой энергией (5–8 МэВ) и коротким пробегом в веществе (десятки микрон), поэтому при локализации достаточного количества атомов α -эмиттера в непосредственной близости от опухолевой клетки достигается избирательное уничтожение злокачественных новообразований при минимальном повреждении окружающих тканей. Для обеспечения избирательной локализации атомов α -эмиттера в основном используются искусственно созданные биохимические соединения – биоконъюгаты, в состав которых входят моноклональные антитела (МАТ) к определенному опухолевому антигену (в виде фрагментов или модификаций), – белковая структура, являющаяся каркасом биоконъюгата, и химические соединения, к которым можно прикрепить радионуклиды. Разработка таргетных препаратов РИТ, меченных ^{212}Bi и ^{213}Bi , проводятся за рубежом с конца 1980-х годов [1–8].

Использование короткоживущих радионуклидов для РИТ принципиально. Для эффективного использования радионуклидов за вре-

мя, соизмеримое с их периодом полураспада, необходимо получить радионуклиды, произвести их синтез с биоконъюгатом, выполнить контроль основных параметров и отобрать активность, необходимую для введения пациенту. Решить эту задачу можно двумя путями:

- ✓ созданием автоматизированного модуля синтеза биоконъюгата, меченного радионуклидом, который с минимальными временными затратами будет проводить все необходимые операции;
- ✓ использованием *in vivo* генераторов, т.е. применять препараты с биоконъюгатами, меченными материнскими радионуклидами, которые генерируют дочерний нуклид. Для ^{212}Bi таковым является ^{212}Pb . При использовании в качестве метки ^{225}Ac возникают дополнительные преимущества – кроме обеспечения большего времени на подготовительные операции, в процессе распада ^{225}Ac до стабильного ^{209}Bi последовательно выделяются 4 α -частицы, которые также обеспечивают терапевтический эффект. Реализация этого пути возможна при условии достаточной устойчивости биоконъюгатов, меченных материнским радионуклидом на каждом этапе ядерных превращений [9–11].

Цель настоящей работы заключалась в определении и оптимизации условий соединения (мечения) биоконъюгата с радионуклидами ^{212}Bi и (или) ^{212}Pb . Ниже представлены результаты разработки и апробации методики мечения биоконъюгата радионуклидами ^{212}Bi и ^{212}Pb .

Эффективность мечения радионуклидами высокомолекулярных соединений зависит от таких параметров, как состав буферного раствора, его pH, чистота используемых реактивов, температура, время проведения реакции (инкубация) и др. В экспериментах выход меченного радиоизотопом биоконъюгата определяли методом фракционирования раствора после прохождения его через гель-фильтрационную колонку конъюгата.

Материалы

Биоконъюгаты состава “человеческий сывороточный альбумин – гуманизированное МАТ – хелатор”, были разработаны в Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова при участии МНИОИ им. П.А. Герцена, НИЦ “Курчатовский институт” и

ООО “Технология медицинских полимеров” [12–16].

Гуманизированное МАТ 4D5 представляет собой фрагмент мышинового антитела, специфичного к рецептору HER-2/neu, в котором мышинные иммуноглобулины заменены на иммуноглобулины человека для уменьшения реакции отторжения [12, 13].

В качестве молекулы-носителя, к которой “пришивают” мини-антитела, выбран белок человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Использование этого белка не приводит к иммунологическим реакциям. ЧСА несет на своей поверхности большое количество доступных аминокислотных групп, к которым можно пришивать молекулы мини-антител.

К этой конструкции присоединяются бифункциональные хелатирующие агенты (БФХА), способные образовывать достаточно прочные координационные связи с большим количеством катионов (Fe, Zn, Co, Cu, Y, In, Ac, Bi и др.). В качестве хелаторов использованы комплексоны DTPA (Diethylene triamine pentaacetic acid) или DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) и их производные. В данном биоконъюгате, как наиболее чистые и доступные, используются БФХА – DOTA-NSH-ester или p-SCN-Bn-DTPA. Готовый биоконъюгат (ЧСА + МАТ + DOTA или DTPA) находится в буферном растворе MES (2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота). Конъюгат такой формы можно хранить в замороженном виде длительное время.

Источником радионуклидов ^{212}Pb и ^{212}Bi служил генератор $^{228}\text{Th}/^{212}\text{Pb}$ [15]. Реактор генератора содержит смесь изотопов тория, в состав которой входит радионуклид ^{228}Th ($T_{1/2}=1,9$ г). В цепочке распада ^{228}Th присутствует газообразный радионуклид ^{220}Rn ($T_{1/2}=56$ с), который в накопителе генератора в результате β -распада переходит в ^{212}Pb ($T_{1/2}=10$ ч) и осаждается на внутренних стенках. ^{212}Pb смывается со стенок разбавленной соляной кислотой (0,1 моль/л). Полученный раствор используется для мечения или наносится на ионообменную колонку с катионитом DOWEX-50 \times 8, с которой каждые ~3 часа можно десорбировать продукт распада ^{212}Pb – радионуклид ^{212}Bi ($T_{1/2}=60$ мин). При десорбции используется 0,32 М HCl. Управление генератором производится дистанционно с помощью автоматической системы управления. Принципиальная схема генераторов показана на рис. 1.

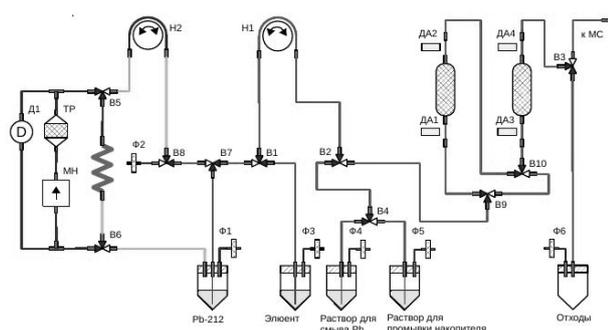


Рис. 1. Схема генераторов ^{228}Th - ^{212}Pb и ^{212}Pb - ^{212}Bi . ТР – реактор с торием; МН – мембранный насос; Д1 – датчик давления; Н1, Н2 – перистальтические насосы; В1-В10 – клапаны, ДА1-ДА4 – датчики активности, Ф1-Ф6 – воздушные фильтры

Радиометрический анализ образцов раствора проводили на гамма-спектрометре высокого разрешения с полупроводниковым детектором из сверхчистого германия HPGe Canberra G0512T и многоканальным анализатором Canberra InSpector2000. Разрешение спектрометра в области энергий 250 кэВ составляло 0,7–0,8 кэВ.

Методика определения параметров выхода мечения

Экспериментальная часть работы заключалась в определении эффективности мечения биоконъюгата радионуклидом, которая определялась как отношение активности радионуклида в составе биоконъюгата к величине полной активности радионуклида, используемой в процессе мечения. Процедура мечения проводилась в реакторе модуля синтеза (МС) и включала в себя:

1. Отбор из генератора раствора с радионуклидом в реактор МС (примерно 400 мкл, активностью порядка 1×10^5 – 3×10^6 Бк). Определение его активности.
2. Подготовку раствора радионуклида к процедуре мечения конъюгата (кондиционирование). Одно из требований – рН раствора должно иметь величину вблизи нейтрального значения.
3. Добавление к кондиционированному раствору радионуклида 100 мкл раствора, содержащего 100 мкг биоконъюгата состава ЧСА – МАТ – БФХА. Инкубирование раствора

в течение определенного времени и температуры (термостат).

4. Готовый раствор наносится на гель-фильтрационную колонку (ГФК) и элюируется примерно 5 мл MES.
5. Раствор после прохождения ГФК фракционируется (по 0,2–0,5 мл) и контролируется на содержание белка (окрашивание Кумасси [19]) и величину активности.

Для разделения компонент растворов в экспериментах использовалась гель-фильтрационная колонка PD MidiTrap G-25, объемом жидкой фазы 1 мл. В паспорте колонки дается калибровка при использовании в качестве буфера изотонического раствора. Биоконъюгат поступал в другом буфере – в растворе MES (2-(N-морфолино)-этансульфоновая кислота). Поэтому колонка заново калибровалась, и определялись области нахождения высокомолекулярной фракции (фракция биоконъюгата массой около 100 кДа) и низкомолекулярной фракции (солевой фракции несвязанного с белком радионуклида). Процесс калибровки состоял из проведения всех этапов процедуры мечения (см. выше) и повторения процедуры мечения без конъюгата (исключение операции 3). Как показала калибровка, при использовании в качестве элюирующего раствора MES фракция биоконъюгата находится в интервале от 1,2 до 2,7 мл, а фракция несвязанного ^{212}Bi в виде цитрата находится в интервале от 2 до 4 мл. График кривой элюирования ГФК для этих двух растворов представлен на рис. 2. Разрешение ГФК (наложение белкового пика и солевого) зависит от наполнителя (размер пор) ГФК и ее величины (объема). Улучшение разрешения ГФК – отдельная задача. В этой работе она не решалась.

Для надежности и точности проведения повторяющихся процедур мечения биоконъюгата радионуклидом за время, ограниченное коротким периодом полураспада радионуклида, был создан автоматизированный модуль синтеза с удаленной системой управления. Принципиальная схема приведена на рис. 3.

Генератор радионуклидов выдает солянокислые растворы ^{212}Bi в 0,32 моль/л HCl и ^{212}Pb 0,1 моль/л HCl. Для мечения конъюгатов эти растворы надо перевести в нейтральные (операция 2 процедуры мечения). Учитывая особенность висмута гидратироваться при увеличении рН, перевод растворов в нейтральные проводили используя сначала основные соли (цитраты, ацетаты или фосфаты), после

чего доводили pH до нейтрального сильным основанием. Эксперимент показал, что величина мечения в основном определяется видом и концентрацией основной соли при подготовке раствора радионуклида к процессу мечения и видом БФХА в конъюгате.

Собственно эксперимент состоял из 1) определения активности раствора радионуклида, используемого для мечения; 2) проведения операций (1–5) процедуры мечения и 3) отбора из ГФК раствора от 1,2 мл до 2,7 мл и измерение его активности. Отношение этой активности к измеренной по п. 1 дает значение величины выхода мечения. Нижеприведенные рисунки дают качественное представление о процессе мечения.

На рис. 4 представлены кривые элюирования после мечения радионуклидами ^{212}Pb и ^{212}Bi биоконъюгата DTPA-HSA-mAT. Значение pH 4,5, для нейтрализации использовались соли лимонной кислоты (цитраты), продолжительность инкубирования 10 мин. Выход мечения для свинца составил около 84 %, а для висмута – 82 %.

На рис. 5а представлены результаты мечения конъюгата DOTA-HSA-mAT из цитратного раствора. Величина выхода незначительная (менее 30 %), большая часть активности присутствует в солевой фракции. На рис. 5б представлена кривая элюирования конъюгата DOTA-HSA-mAT из цитратного раствора, в котором концентрация используемого комплексообразователя по сравнению с предыдущим экспериментом была уменьшена в 12 раз. Из этой зависимости видно, что большая часть свинца перешла в белковую фракцию (выход мечения

составил около 84 %), а соотношение белковой и солевой фракций для висмута сравнялось (выход мечения 54 %).

В случае получения меченного конъюгата из ацетатного буфера к солянокислому раствору радиоизотопов добавлялось 50 мкл раствора 1 М ацетата натрия, после чего добавлялось 20 мкл раствора 2 М гидроксида натрия. pH полученного раствора составлял 4,7. Проведено 2 параллельных эксперимента: с конъюгатами DOTA-HSA-mAT и DTPA-HSA-mAT. Кривые распределения активности для этих веществ представлены на рис. 6 и 7.

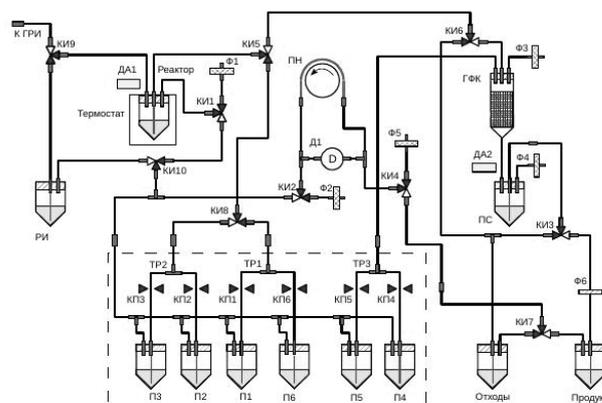


Рис. 3. Схема модуля синтеза: ПН – перистальтический насос, ДА1–ДА2 – датчики активности, Д1 – датчик давления, КИ1–КИ8 – соленоидные клапаны, КП1–КП – пережимные клапаны, П1–П6 – фляконы с расходными реактивами; Ф1–Ф5 – воздушные фильтры, Ф6 – стерилизующий фильтр

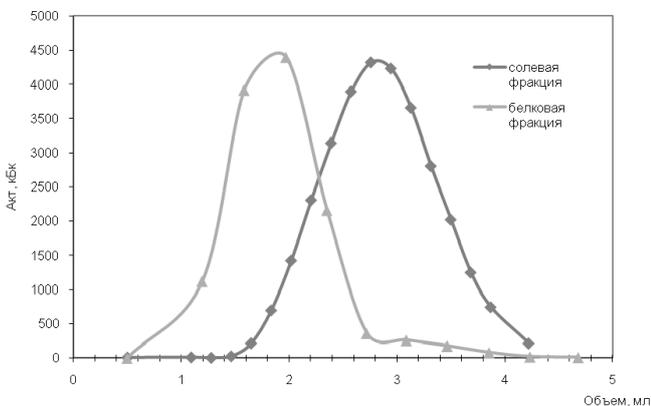


Рис. 2. Кривая элюирования гелевой фильтрационной колонки двух растворов

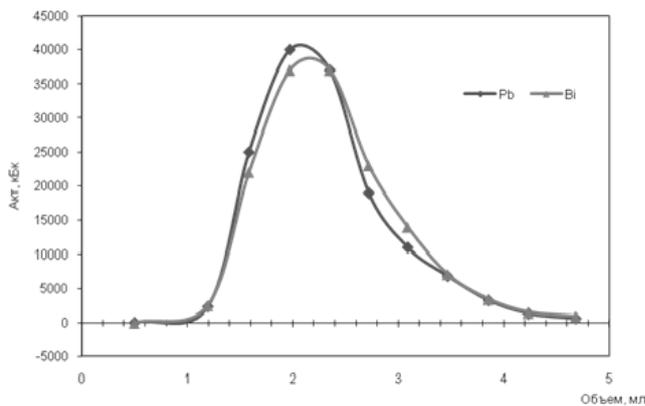


Рис. 4. Кривая элюирования биоконъюгата Pb-DTPA-HSA и Bi-DTPA-HSA после пропускания через ГФК

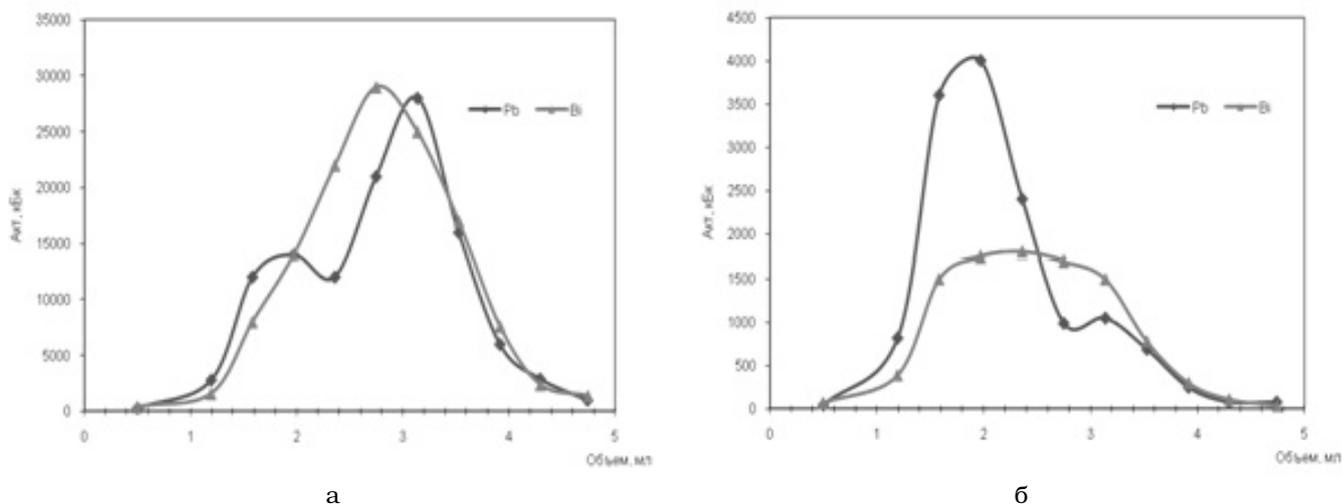


Рис. 5. Кривые элюирования биоконъюгата Pb-DOTA-HSA (а) и Bi-DOTA-HSA (б) после пропускания через ГФК

При использовании фосфатного буфера к раствору после ионообменной колонки добавлялся раствор 1 М Na_2HPO_4 в количестве 50 мкл, а уровень pH доводился 10 мкл 2 М раствора гидроксида натрия до значения 5. Результаты элюирования конъюгата из фосфатного буфера приведены на рис. 8 и 9.

Сводные данные по всем выполненным экспериментам приведены в табл. 1.

Заключение

Используемые в конъюгатах БФХА p-SCN-Vn-DTPA и DOTA-NHS-ester, сопряженные с молекулой человеческого сывороточного альбумина с рекомбинантным гуманизированным антителом 4D5, специфичным к антигену HER-2/neu, позволяют закрепить радионуклид на данной конструкции. Использование ацетатного или фосфатного буфера позволяет пол-

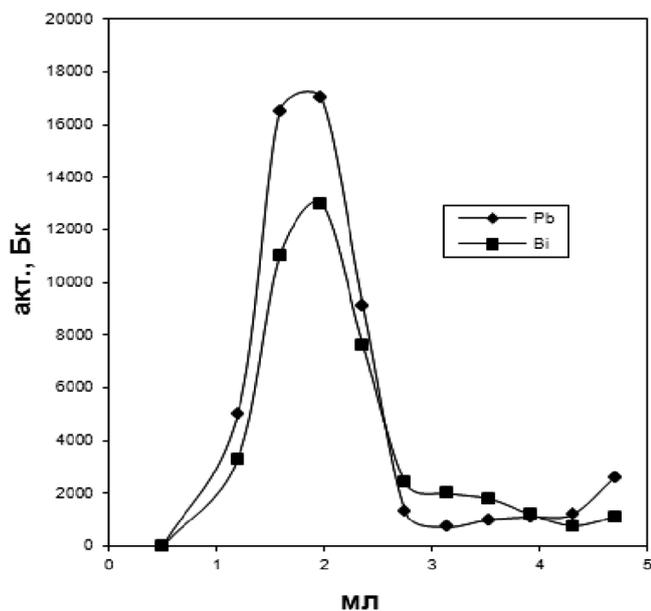


Рис. 6. Кривая элюирования биоконъюгата Pb-DOTA-HSA и Bi-DOTA-HSA после пропускания через ГФК из ацетатного буфера

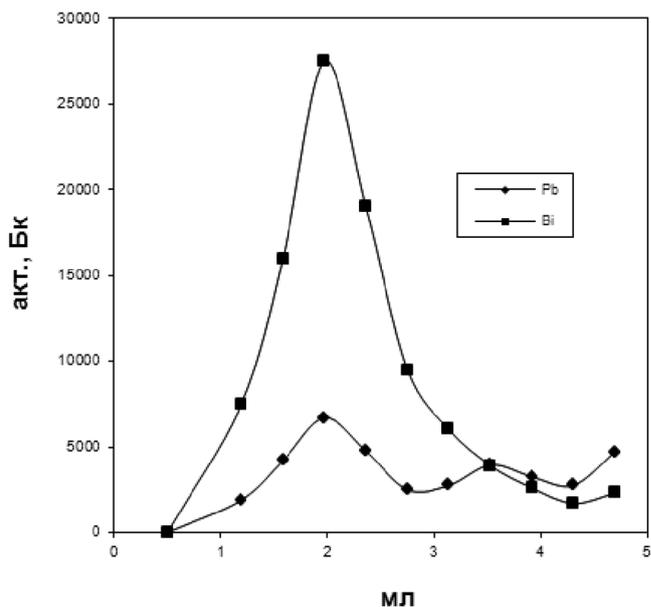


Рис. 7. Кривая элюирования биоконъюгата Pb-DTPA-HSA и Bi-DTPA-HSA после пропускания через ГФК из ацетатного буфера

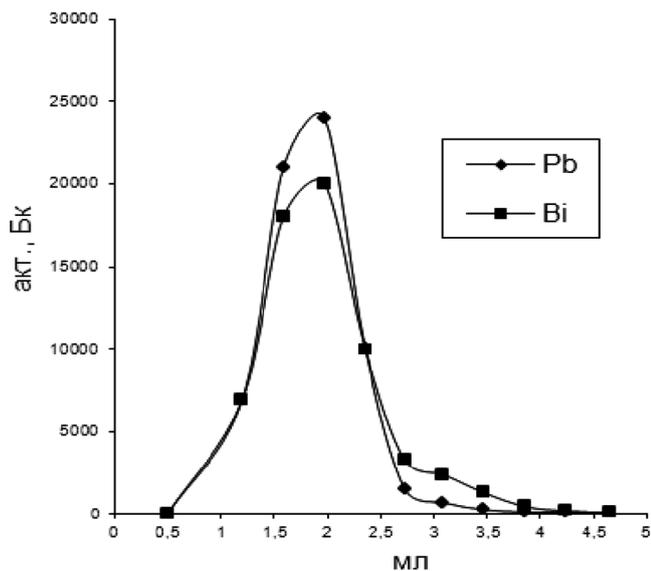


Рис. 8. Кривая элюирования биоконъюгата Pb-DOTA-HSA и Bi-DOTA-HSA после пропускания через ГФК из фосфатного буфера (рН 5,3)

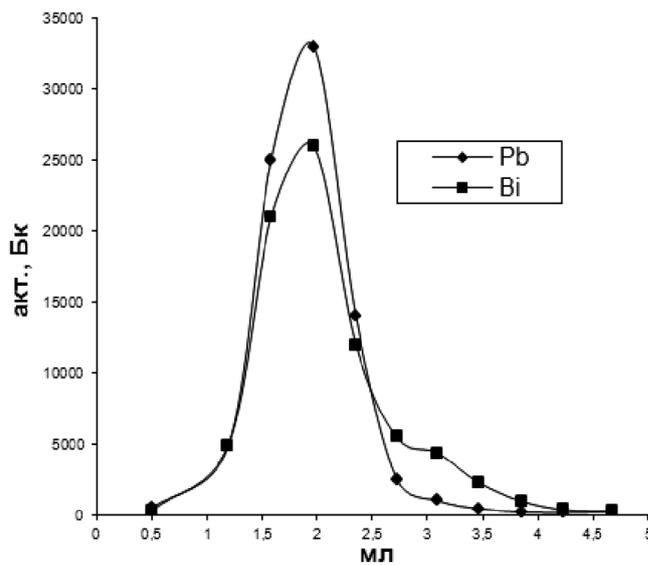


Рис. 9. Кривая элюирования биоконъюгата Pb-DTPA-HSA и Bi-DTPA-HSA после пропускания через ГФК из фосфатного буфера (рН 5,3)

ностью отделить целевую белковую фракцию от непрореагировавшего радионуклида с помощью эксклюзионной гель-фильтрации. Мечение радионуклидом ^{212}Pb из фосфатного буфера позволяет получить продукт с выходом 85 % (для DOTA) и 88 % (в случае DTPA). Мечение радионуклидом ^{212}Bi из этого же буфера возможно провести с выходом 88 % (в случае DTPA) и 96 % (в случае DOTA).

Разработанная методика и оборудование обеспечивает получение радиофармацевтической субстанции с α -излучателями для дальнейших биологических исследований.

Благодарности

Авторы выражают благодарность чл.-корр. РАН С.М. Дееву и В.А. Головаченко за предоставления для работы конъюгатов, Ю.А. Яшину за проведение спектрометрических измерений, А.С. Захарову за помощь в работе.

Список литературы

1. Macklis R.M., Kinsey B.M., Kassis A.I. et al. Radioimmunotherapy with alpha-particle-emitting immunoconjugates. // Science, 1988, **240**, P. 1024–1026.

Таблица 1

Результаты экспериментов по получению меченного конъюгата с использованием ^{212}Pb и ^{212}Bi в различных буферных системах

№ рисунка	Буферный раствор	Объем, мкл	Концентрация, М	рН	Выход мечения, %			
					DTPA-Bi	DOTA-Bi	DTPA-Pb	DOTA-Pb
4	Цитратный	50	1	4,5	82	–	84	–
5а	Цитратный	50	1	4,5	–	30	–	30
5б	Цитратный	4	1	4,5	–	54	–	84
6	Ацетатный	50	1	4,7	–	84	–	88
7	Ацетатный	50	1	4,7	82	–	53	–
8	Фосфатный	50	1	5,3	–	88	–	85
9	Фосфатный	50	1	5,3	96	–	88	–

2. Simonson R.B., Ultee M.E., Hauler J.A., Alvarez V.L. Radioimmunotherapy of peritoneal human colon cancer xenografts with site-specifically modified ^{212}Bi -labeled antibody. // *Cancer Res.*, 1990, **50**, P. 985–988,
3. Huneke R.B., Pippin C.G., Squire R.A. et al. Effective alpha-particle-mediated radioimmunotherapy of murine leukemia. // *Cancer Res.*, 1991, **52**, P. 5818–5820.
4. Hartmann F., Horak E.M., Garmestani K. et al. Radioimmunotherapy of nude mice bearing a human interleukin 2 receptor alpha-expressing lymphoma utilizing the alpha-emitting radionuclide-conjugated monoclonal antibody ^{212}Bi -anti-Tac. // *Cancer Res.*, 1994, **54**, P. 4362–4370.
5. Jurcic J.G., Larson S.M., Sgouros G. et al. Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. // *Blood*, 2002, **100**, P. 1233–1239.
6. Mulford D.A., Pandit-Taskar N., McDevitt M.R. et al. Sequential therapy with citarabin and bismuth-213 (^{213}Bi)-labeled HuM-195 (anti-CD(anti-CD33) for acute myeloid leukemia. // *Blood*, 2004, **104**, P. 496a.
7. Allen B.J., Raja C., Rizvi S. et al. Targeted alpha therapy for cancer. // *Cancer Biology & Therapy*, 2005, **4**, P. 1318–1324.
8. Kneifel S., Cordier D., Good S. et al. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazocyclododecane-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance. // *Clinical Cancer Res.*, 2006, **12**, P. 3843–3850.
9. Brechbiel M.W., Pippin C.G., McMurry T.J. et al. Synthesis of bifunctional chelators for ^{212}Bi : Effective α -particle radioimmunotherapy in mice. // *J. Inorganic Biochem.*, **43**, Issue 2, P. 630.
10. Bartos B., Lyczko K., Kasperek A. et al. Search of ligands suitable for $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ *in vivo* generators. // *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 2013, **295**, P. 205–209
11. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения. // *Acta Naturae*, 2009, № 1, С. 32–50.
12. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. Инженерия антител: молекулярный конструктор на основе модуля барназа-барстар. // *Биоорганическая химия*, **35**, С. 761–778.
13. Болдырев П.П., Деев С.М., Головаченко В.А. и соавт. Критерии отбора радионуклидов для радиоиммунотерапии. // *Мед. физика.*, 2013, № 3 (59), С. 66–72.
14. Головаченко В.А., Деев С.М., Загрядский В.А. и соавт. Препринт РНЦ “Курчатовский институт” ИАЭ 6536/13. – М., 2008.
15. Болдырев П.П., Борташ А.И., Загрядский В.А. и соавт. // *Атомная энергия*, 2011, **111**, № 6. С. 348–352.
16. Чувилин Д.Ю., Загрядский В.А., Дубинкин Д.О. и соавт. Способ получения радиоиммунного препарата для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Заявка на патент РФ 2013113290/15(019683) от 26.03.2013. Получено решение о выдаче патента на изобретение от 15.09.2014.

**RADIOLABELED ANTIBODIES 4D5 SPECIFIC HER-2/neu
BY α -EMMITING RADIONUCLIDES ^{212}Bi И ^{212}Pb**

*P.P. Boldyrev, N.Yu. Kochetkova, M.A. Proshin, R.F. Nurtdinov, A.N. Semenov
NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

Targeted alpha therapy is often referred as a treatment of choice for minimum residual diseases. Single passage of alpha-particle through a tumour cell nucleus has been shown to be very toxic and, as a result, alpha-particles can inactivate single cells or small clusters without requiring important cross-fire. Labeling of a biochemical compound (conjugate) with α -emitting radionuclides was studied with the aim to develop a biochemical substance for targeted delivery to a cancer cell. The ^{212}Bi ($^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$) isotope generator were developed. A procedure for preparing the conjugate (monoclonal antibody + chelator) with α -emitting isotopes ^{212}Bi and ^{212}Pb and methods for identification of the labeled conjugate are presented. The experiments radiochemical yield of targeting for complexing DOTA was more than 85 %, for DTPA – more than 88 % with the use of phosphate buffer.

Key words: *radionuclide therapy, α -emitting radionuclides, oncomarker HER-2/neu, yield of targeting*

E-mail: nurtdinov@list.ru