

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.097;576.8.077

©Коллектив авторов

### ИССЛЕДОВАНИЕ БИОДЕГРАДАЦИИ МЕЧЕННЫХ <sup>125</sup>I МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ СИСТЕМНОМ ВВЕДЕНИИ КРЫСАМ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОМОЙ С6

**В.П. Чехонин<sup>1\*</sup>, К.А. Буланов<sup>2</sup>, Г.М. Юсубалиева<sup>1</sup>, Е.А. Цибулькина<sup>2</sup>,  
О.И. Гурина<sup>1</sup>, Ю.С. Скоблов<sup>3</sup>, В.И. Швец<sup>2</sup>, Ю.А. Жирков<sup>1</sup>, В.П. Баклаушев<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Лаборатория иммунохимии ФГУ "ГНЦССП им. В.П. Сербского" Росздрава.  
119992, Москва, Кропоткинский пер., 23, отдел биологической психиатрии;  
тел.: (495)202-28-13

<sup>2</sup>Кафедра биотехнологии МИТХТ им. М.В. Ломоносова. 119571, Москва,  
пр. Вернадского, 86; тел.: (495)434-82-33

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
РАН. 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; тел.: (495)330-69-47

Применение в биологических исследованиях радиоактивно меченных антител позволяет с высокой точностью проследить их специфичное накопление в различных органах и тканях. Однако устойчивость получаемых конъюгатов антител с радиоактивной меткой сильно зависит как от способа мечения, так и от условий эксперимента. Поэтому в каждом конкретном исследовании необходима оценка степени деградации меченых антител в рассматриваемых тканях. В данной работе мы исследовали устойчивость меченных <sup>125</sup>I моноклональных антител к глиофибрилярному кислому белку (GFAP) и эндотелиальному антигену AMVB1 на стадии их получения и после внутривенного введения животным с экспериментальной глиомой С6. Определение устойчивости конъюгатов проводили методом осаждения трихлоруксусной кислотой из образцов крови и гомогенатов органов. Показана высокая радиохимическая чистота, иммунохимическая активность и стабильность полученных препаратов <sup>125</sup>I-меченных антител в крови и в тканях после введения *in vivo* в мозг. С использованием методов электрофоретического анализа, тонкослойной хроматографии и иммуногистохимических тестов показана высокая устойчивость полученных радиоактивно меченных антител в крови и в тканях *in vivo*, подтверждена радиохимическая чистота препаратов антител и их иммунохимическая активность.

**Ключевые слова:** глиома С6, биодеградация, радиоактивно меченные антитела, моноклональные антитела

**ВВЕДЕНИЕ.** Как любые белки, меченые иммуноглобулины при введении в кровь могут подвергаться воздействию сывороточных и тканевых протеолитических ферментов. Образующиеся при этом низкомолекулярные радиоактивные фрагменты чаще всего не обладают необходимой специфичностью, и их распределение в органах и тканях создаёт неспецифический "фон", мешающий правильной интерпретации результатов. В экспериментах с радиомечеными антителами их биодеградация *in vivo* зачастую не учитывается, однако протеолиз антител, если он достаточно выражен, может существенно влиять на распределение радиоактивной метки в органах и тканях [1-3].

На рассматриваемой модели экспериментальной глиомы С6 достоверно показано образование “глиального вала” по периферии опухоли, состоящего из реактивных астроцитов, в большом количестве экспрессирующих глиофибрилярный кислый белок (GFAP) [4]. Этот феномен открывает перспективы применения радиоактивно меченых антител к GFAP для визуализации и возможно для векторной радиоиммунотерапии глиомы. Другим весьма перспективным направлением является селективный транспорт в область опухоли различного рода терапевтических агентов (в том числе и генетического материала) в составе стерически экранированных транспортных систем на основе моноклональных или рекомбинантных антител. В этом случае в качестве векторных молекул рассматриваются антитела к мембранным белкам эндотелиоцитов, способные обеспечить захват микроконтейнера из кровотока. Одним из таких антигенов является мембранный белок AMVB1, экспрессирующийся на аблюминальной мембране эндотелиоцитов капилляров мозга и некоторых других органов. Полученные нами высокоаффинные моноклональные антитела (MAb) 2mB6 к этому антигену также рассматриваются в данном исследовании с точки зрения устойчивости в составе конъюгата с радиоактивной меткой.

Целью данной работы была количественная оценка биodeградации антител к GFAP и эндотелиальному антигену AMVB1 при введении в кровоток крысам с экспериментальной глиомой.

#### МЕТОДИКА.

*Получение радиоактивно меченных антител.* В эксперименте использовали очищенные препараты полученных в лаборатории иммунохимии ГНЦССП им. В.П. Сербского высокоаффинных MAb 2mB6 и анти-GFAP, а также неспецифических иммуноглобулинов мыши (IgGm). Конъюгирование радиоактивного йода с препаратами антител проводили с помощью Йодогена (Sigma) в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,2. К 1 мг белка добавляли 1 мКи (37 МБк, 500 пМ)  $\text{Na}^{125}\text{I}$  и перемешивали 20 мин в пробирке, содержащей 150 мкг нерастворимого йодогена. После этого жидкую фазу, содержащую меченый белок и несвязавшийся йодид, отделяли и обессоливали гель-фильтрацией в сефадексе G50. В полученных пробах очищенных  $^{125}\text{I}$ -меченных антител спектрофотометрически определяли концентрацию белка, оценивали общую радиоактивность на счетчике RackBeta (LKB) и вычисляли удельную радиоактивность антител. Средняя эффективность мечения для трёх препаратов антител составляла  $40 \pm 8\%$ . Радиохимическую чистоту конъюгатов антител определяли методами тонкослойной хроматографии и диск-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Иммунохимическую активность полученных препаратов проверяли в иммуногистохимическом анализе на замороженных срезах мозга крысы толщиной 40 мкм.

*Тонкослойная хроматография.* Тонкослойную хроматографию проводили на стеклянных пластинах с силикагелем; капилляром наносили по 1 мкл образцов обессоленных меченых антител и раствор неорганического радиоактивного йода в качестве контроля. Пластинку погружали в хроматографическую кювету с системой этанол:вода (50:50) с добавлением 0,1 М “холодного” NaI. Последний добавляли в систему для блокирования неспецифических центров связывания  $^{125}\text{I}$  на силикагеле. После хроматографии пластинку высушивали и сканировали в сцинтилляционной камере Instant Imager (“Hewlett Packard”, USA).

*Диск-электрофорез в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.* Диск-электрофорез очищенных препаратов антител проводили по методу L. Ornstein и B.J. Davis [5], в модификации A.L. Shapiro et al. [6] с использованием реактивов и методических разработок фирмы “Amersham Biosciences” (Швеция). Для концентрирующего геля применялся 0,05 М трис-HCl буфер (pH 6,8) для разделяющего - 1,5 М трис-HCl буфер (pH 8,7). В качестве электродного

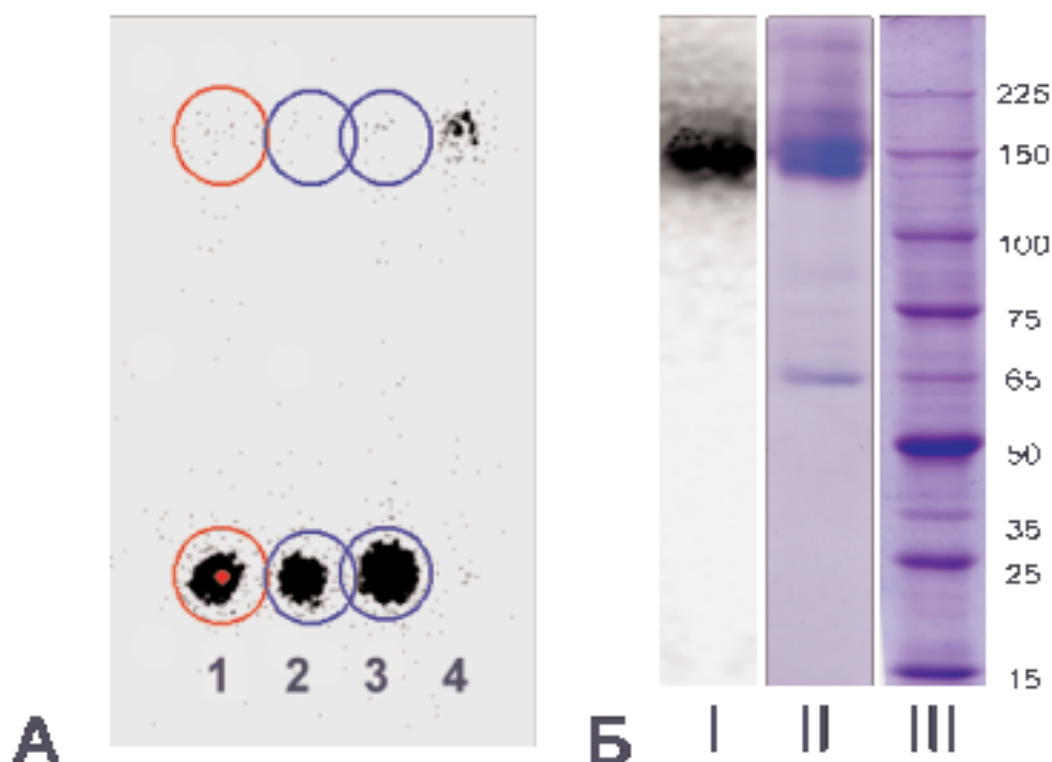
применялся 0,05 М трис-глициновый буфер (pH 8,3). Электрофорез проводили в 7,5% разделяющем геле в электрофоретической мини-камере для вертикального электрофореза фирмы "Helicon" (Россия) с помощью источника питания фирмы "LKB" (Швеция) при силе тока 0,5 мА/см<sup>2</sup>. По 5 мкг образца радиомеченных антител (α-GFAP, 2mB6 и неспецифические иммуноглобулины мыши) вносили в гель в объёме 5-10 мкл параллельно с маркерами молекулярной массы 15-225 кДа (Promega). Для визуализации белковых бендов гель окрашивали в 0,1% растворе кумасси R-250 в 40% метаноле и 10% уксусной кислоте в течение 30 минут; отмывку от избытка краски производили в 10% растворе уксусной кислоты и 10% метаноле.

*Введение радиоактивно меченных антител животным.* Двенадцать самок крыс Вистар весом 200 г. с верифицированной интрацеребральной глиомой С6 (16-е сутки), моделированной как описано ранее [4], случайным образом поделили на три группы по 4 животных в соответствии с тремя видами <sup>125</sup>I-меченных моноклональных антител (анти-GFAP, 2mB6 и IgGm). Учитывая, что удельная радиоактивность антител была примерно одинакова (0,15-0,2 мКи/мг), при стандартизации вводимой дозы ориентировались на концентрацию белка (50 мкг на крысу). Препараты антител вводили в объёме 300 мкл PBS в бедренную вену, которую выделяли под кетаминным наркозом (10 мг на 100 г веса тела). Спустя 24 часа животных перфузировали физиологическим раствором и выделяли органы и мозг (отдельно правое и левое полушария).

*Кислотная преципитация.* Биodeградацию введенных крысам радиоактивно меченных антител оценивали с помощью метода кислотной преципитации в модификации Banks et al. [7]. Органы крыс, замороженные сразу после перфузии, измельчали, гомогенизировали до однородного состояния в гомогенизаторе Поттера с кварцевым песком и переносили в микропробирки на 1,5 мл. К полученным образцам добавляли 50% раствор трихлоруксусной кислоты в соотношении 1:1 (объем гомогената органов составлял 0,4 мл; объем образцов крови, отобранной из бедренной вены - 0,2 мл). После перемешивания пробы инкубировали в течение 1 часа при +4°C. Затем образцы центрифугировали 15 минут при 6000 g, отбирали надосадок в отдельные микропробирки и измеряли активность образцов на сцинтилляционном счетчике RackBeta (LKB). Долю радиоактивности, обусловленную связанным с антителами йодом, определяли как отношение активности осадка к суммарной активности образца.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В нашем исследовании мы использовали для конъюгирования с антителами радиоактивный изотоп <sup>125</sup>I, поскольку он сочетает "мягкую" γ-эмиссию ( $E_{\max} = 0,35$  мэВ) с достаточно высоким периодом полураспада (60,1 суток). В качестве йодирующего агента был выбран йодоген, вследствие того, в отличие от хлорамина и других окислителей, йодоген в меньшей степени приводит к денатурации иммуноглобулинов [8]. Разделение реакционной смеси осуществляли методом гель-фильтрации на микроколонках с сефадексом G-25. Применение одноразовых микроколонок позволяет одновременно обрабатывать несколько образцов меченых антител, избегая свойственного традиционной гель-фильтрации разбавления белковой фракции.

Полученные обессоленные препараты радиоактивно меченных антител исследовали на наличие примесей радиоактивного неорганического йода методом тонкослойной хроматографии. В выбранной системе элюции меченый белок остаётся на старте, в то время как неорганический йодид движется вместе с фронтом элюции ( $R_f$  0,9 - 0,95). Рассчитанная по интенсивности пятен с помощью электронного сцинтилляционного счетчика Instant Imager (HP, USA) чистота обессоленных антител составляла не менее 99% (рис. 1А), что свидетельствует о высокой эффективности очистки препаратов антител методом микроколоночной гель-фильтрации.



**Рисунок 1.**

Результаты оценки чистоты полученных препаратов  $^{125}\text{I}$ -меченных антител.

А. Электронная автордиограмма ТСХ. Обозначения треков:

1. - MAb2mB6; 2. -  $\alpha$ -GFAP;

3. - IgGm; 4. -  $\text{Na}^{125}\text{I}$ .

Б. Диск-электрофорез очищенных препаратов  $^{125}\text{I}$ -MAb. Обозначения:

I - электронная автордиограмма геля после электрофореза  $^{125}\text{I}$  меченных MAb 2mB6;

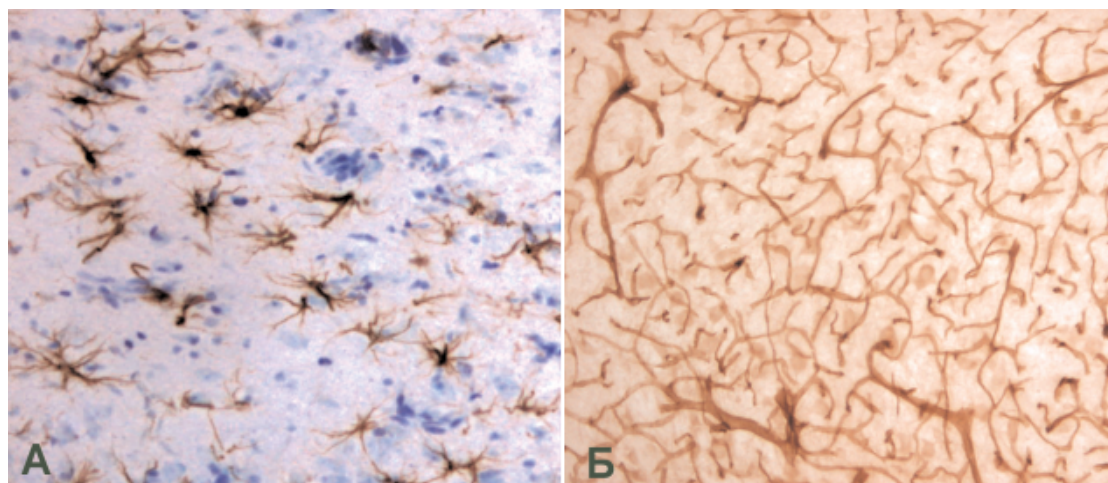
II - та же электрофореграмма, окрашенная кумасси R-250; III - маркеры молекулярной массы

15 - 225 кДа, окрашенные кумасси R-250.

Степень загрязнения полученных препаратов радиоактивными низкомолекулярными продуктами гидролиза антител оценивали методом диск-электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия с последующим количественным определением доли радиоактивности в зоне 160 кДа от общей радиоактивности. Для этого влажный гель помещался в электронную сцинтилляционную камеру, экспонировался и полученная автордиограмма совмещалась с электрофореграммой маркеров молекулярной массы (рис. 1Б). Степень чистоты цельных  $^{125}\text{I}$ -меченых иммуноглобулинов, согласно результатам диск-электрофореза, составила не менее 98%.

Иммунохимическую активность радиоактивных антител после всех манипуляций оценивали на срезах мозга крысы методом иммунопероксидазного окрашивания в последовательных разведениях (рис. 2). Было отмечено, что специфическая активность антител после йодирования и последующего обессоливания снижается не более чем на 20%.





**Рисунок 2.**

Иммуногистохимический анализ  $^{125}\text{I}$ -меченных моноклональных антител к GFAP (А) и к AMVB1 (Б) на срезах головного мозга крысы.

А. Анти-GFAP 1:5000; Ядра клеток докрашены 0,1% толуидином.  $\times 400$ . Б. МАb 2mB6 1:10000;  $\times 200$ . Вторые антитела BA-2000 (Vector Lab. USA) 1:200; комплект авидин-биотин пероксидаза (ABC Vector Lab. USA) 1:200; проявление иммонопериоксидазной активности 0,01% диаминобензидин с  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что выбранная схема йодирования и очистки позволяет получить иммунохимически активные препараты  $^{125}\text{I}$ -антител достаточной удельной радиоактивности (0,15 - 0,2 мкКи/мг) и высокой чистоты (более 98%).

Следующей задачей исследования было оценить уровень биodeградации радиоактивно меченных антител в крови и различных органах и тканях после внутривенного введения. Количественную оценку устойчивости антител в этих условиях проводили с помощью кислотной преципитации белков трихлоруксусной кислотой (ТХУ) при 20-30% насыщении и последующим анализом радиоактивности осадка и надосадка. Исследовали кровь экспериментальных животных в различное время после введения меченных антител, а также отдельные органы, взятые немедленно после перфузии или хранившиеся при  $-20^\circ\text{C}$ .

Полученные данные для образцов с равными введенными дозами препаратов объединяли и обрабатывали статистически с использованием пакета компьютерных программ статистического анализа Prophet 5.0 (BBN SYSTEMS AND TECHNOLOGIES, A Division of Bolt Beranek and Newman, Inc.).

На всех проанализированных временных точках (1, 10 мин, 1 и 24 часа) для исследуемых антител доля свободной (неосаждаемой) радиоактивности в крови не превышала 5% (рис. 3). Это свидетельствовало о высокой устойчивости аллогенных антител при внутривенном введении крысам. Однако, следует учитывать, что отсутствие низкомолекулярной радиоактивной фракции в крови может быть обусловлено быстрым связыванием отщепленного от антител радиоактивного йода белками сыворотки крови и его последующим захватом цитовидной железой.

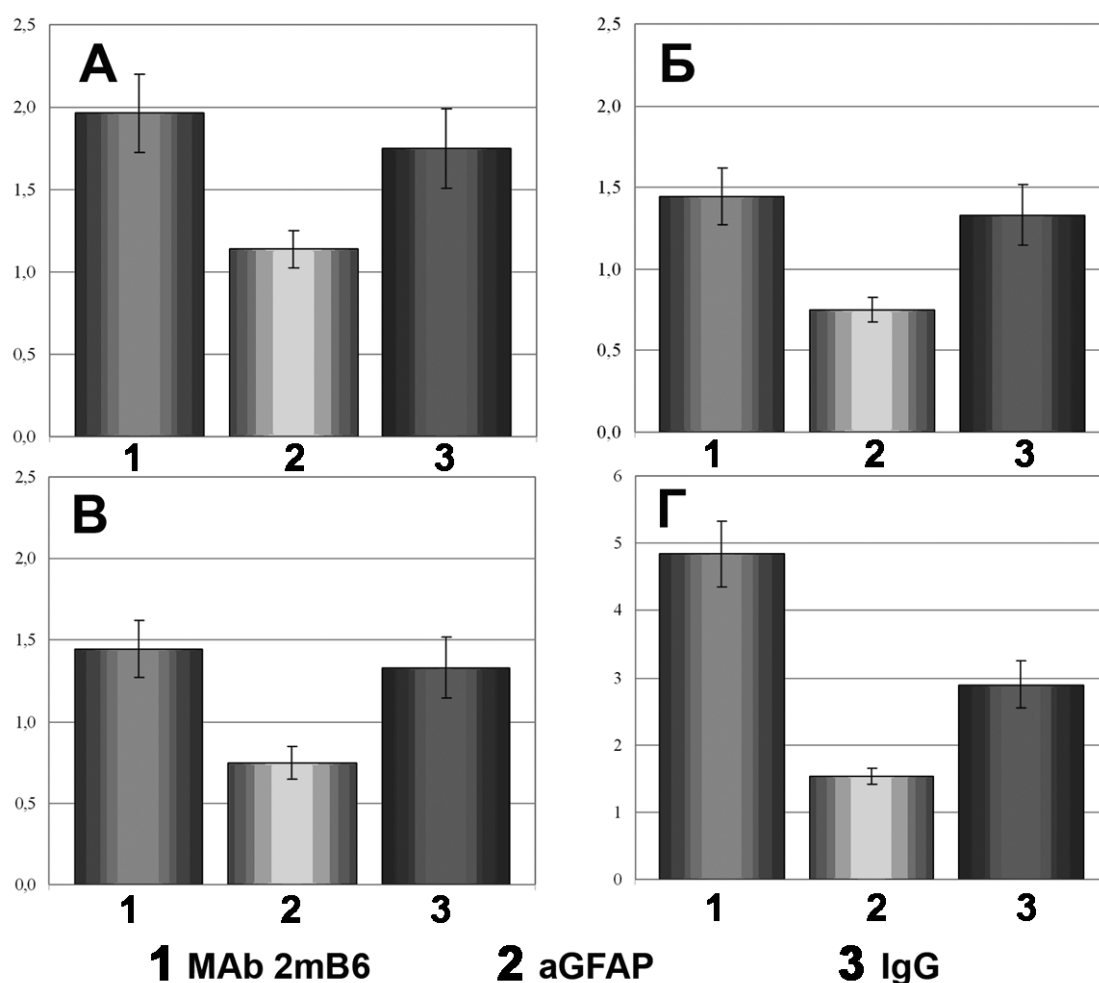


Рисунок 3.

Уровни неосаждаемой радиоактивности в крови (% от общей радиоактивности) после введения  $^{125}\text{I}$ -меченных антител.

Обозначения: А. - 1 минута после введения MAb; Б. - 10 минут; В. - 1 час; Г. - 24 часа.

Это предположение было проверено в эксперименте *in vitro*. К 0,2 мл свежей нативной крови добавляли в одном случае радиоактивно меченные антитела, а в другом - раствор неорганического радиоактивного йодида. Образцы инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре и замораживали. Затем их обрабатывали по стандартной методике. Полученные результаты показали, что в случае радиоактивно меченных антител 98% от взятого количества после инкубации с кровью осаждается ТХУ, а при использовании неорганического йодида 66% оказывается связанными с белками плазмы крови и также осаждается ТХУ. Таким образом, определение в крови отщепленного неорганического йода весьма затруднено и возможно лишь для приблизительной оценки.

Несмотря на предположение о том, что вне зависимости от специфичности антител они должны в равной степени подвергаться биодegradации, в ходе исследования было обнаружено, что антитела 2mB6 проявляют значительно большую устойчивость, которая во всех рассмотренных органах не превышала 3%. Поскольку все три вида исследуемых антител являются мышиными моноклональными иммуноглобулинами G<sub>1</sub>, этот феномен можно объяснить лишь

особенностями взаимодействия МАb со специфическим антигеном. В отличие от антител к GFAP и неспецифических иммуноглобулинов мыши антитела 2mB6 распознают эндотелиальный антиген, экспрессирующийся в исследуемых органах, особенно — в селезёнке. Поскольку в селезёнке для МАb 2mB6 наблюдалась максимальная устойчивость (около 99%), можно предположить, что взаимодействие со специфическим антигеном в определённой степени препятствует биодegradации антител.

Анализ устойчивости радиоактивных конъюгатов в тканях проводили для органов, накапливающих меченые антитела в наибольшем количестве (печень, селезенка, почка и головной мозг). Расщепление радиоактивно меченных антител в указанных органах может происходить за счет действия матриксных и внутриклеточных протеолитических ферментов. Данные анализа неосаждаемой радиоактивности в гомогенатах органов свидетельствуют об относительно высокой стабильности конъюгатов в условиях воздействия ферментов тканей (рис. 4). В печени и почках деградации подвергаются около 20% меченных антител к GFAP и IgGm, тогда как в селезёнке этот показатель составляет лишь 10-12%.

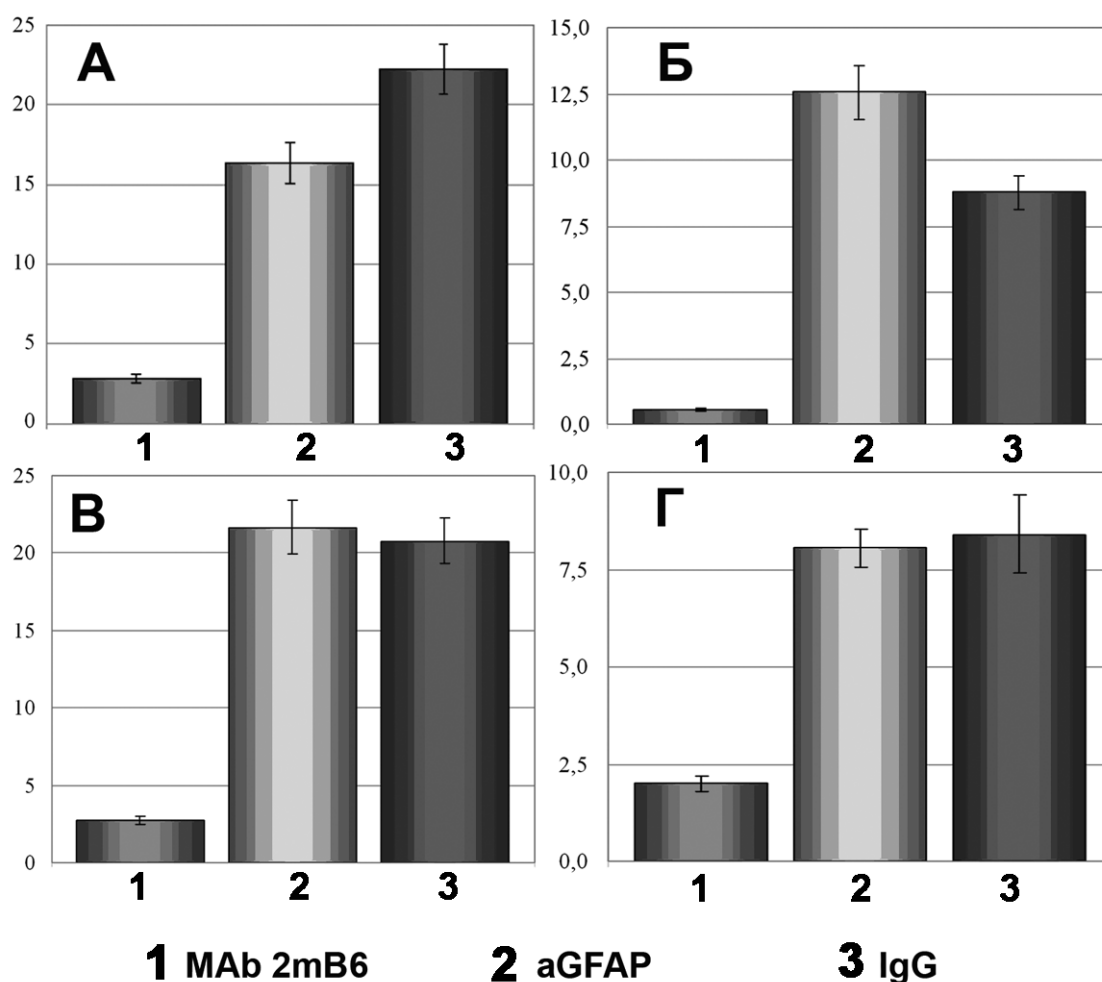


Рисунок 4.

Уровни неосаждаемой радиоактивности в органах (% от общей радиоактивности) через 24 часа после введения  $^{125}\text{I}$ -меченных моноклональных антител.

Обозначения: А. - печень; Б. - селезёнка; В. - почка; Г. - головной мозг.

Исследование щитовидной железы показало, что весь радиоактивный йод, накапливающийся в ней прочно связан со специфическими белками и в пробах этой ткани удается обнаружить не более 5% свободного йода.

Накопление радиоактивно меченных антител в головном мозге животных с экспериментальной глиомой С6 значительно отличается для антител разной специфичности и от рассматриваемого полушария. В пораженном полушарии накопление антител (как специфичных, так и неспецифических) многократно превышает этот показатель для здорового (контрлатерального) полушария. Экспериментальные данные показывают, что в мозге наблюдается достаточно высокая устойчивость рассматриваемых конъюгатов. Спустя сутки после введения <sup>125</sup>I-anti-GFAP и <sup>125</sup>I-IgGm лишь около 8% радиоактивности, накопленной в мозге, обусловлено неорганическим йодом, а в эксперименте с MAb 2mB6 - только 2%. Таким образом, стабильность меченых антител в ткани мозга во всех случаях превышает 90%. Сравнение наших результатов с аналогичными данными других исследователей показывает, что аллогенные антитела *in vivo* в меньшей степени подвергаются биодеградации, чем нативные и модифицированные биологически активные пептиды [7].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Метод конъюгации антител с радиоизотопом во многом предопределяет сохранность их иммунохимических свойств. Правильный выбор радионуклида и системы для его конъюгации с молекулой белка позволяет добиться высокой специфичности конъюгата и предотвратить избыточное накопление радиоактивной метки вне органа-мишени в результате разрушения конъюгата. Оценивать стабильность полученного препарата радиоактивно меченных антител необходимо на всех этапах исследования: при отделении избытка радиоактивной метки, введении животным и при исследовании накопления радиоактивности в тканях. Использованный в данной работе метод определения устойчивости меченых антител показал их высокую стабильность *in vivo* в крови и органах.

Полученные данные позволили внести необходимые поправки в результаты по накоплению радиоактивных антител в органах и тканях и их фармакокинетике при моделировании глиомы С6 на крысах [4].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Goldenberg D.M., Sharkey R.M., Paganelli G., Barbet J., Chatal J.-F. (2006) J. Clin. Oncol., **24**, 824-834.
2. Zalutsky M.R. (2005) J. Nucl. Med., **46** (Suppl.), 151-156.
3. Zalutsky M.R., Moseley R.P., Benjamin J.C. (1990) Cancer Res., **50**, 4105-4110.
4. Чехонин В.П., Баклаушев В.П., Юсубалиева Г.М. (2007) Клеточные технологии в биологии и медицине, (в печати).
5. Ornstein L. (1964) Ann. N.-Y. Acad. Sci., **121**, 321-349.
6. Shapiro A.L., Maizel J.V. Jr. (1969) Anal Biochem., **3**, 505-514.
7. Banks W.A., Goulet M., Rusche J.R. (2002) Pharmacol. Exper. Therap., **302**, 1062-1069.
8. Visser G.W., Klok R.P., Gebbinck J.W. (2001) J. Nucl. Med., **42**(3), 509-519.

Поступила: 14. 05. 2007.



**BIODEGRADATION OF <sup>125</sup>I-LABELED MONOCLONAL ANTIBODIES AFTER  
INTROVENOUS ADMINISTRATION TO RATS WITH EXPERIMENTAL C6 GLIOMA**

***V.P. Chekhonin<sup>1</sup>, K.A. Bulanov<sup>2</sup>, G.M. Yusubalieva<sup>1</sup>, E.A. Tsibulkina<sup>2</sup>, O.I. Gurina<sup>1</sup>, Yu.S. Skoblov<sup>3</sup>,  
V.I. Shvets<sup>2</sup>, Yu.A. Zhirkov<sup>1</sup>, V.P. Baklaushev<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Serbsky National Research Centre for Social and Forensic Psychiatry, Laboratory of Immunochemistry.  
Kropotkinsky per., 23, Moscow, 119992 Russia; tel.: +7(495)202-28-13

<sup>2</sup>M.V. Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technologies, Department of  
Biotechnology. Vernadskogo pr-t, 86, Moscow, 119571 Russia; tel.: +7(495)434-82-33

<sup>3</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of  
Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia; tel.: +7(495)330-69-47

Employment of radiolabeled antibodies in biological studies allows their specific accumulation in organs and tissues to be detected. However, stability of such labeled antibodies depends on both the method of labeling and particular experimental conditions. Therefore, stability of labeled antibodies should be determined in every particular experiment. The present paper describes the results obtained in the study of the radiochemical purity and stability of the <sup>125</sup>I-labeled conjugates of antibodies to the gliofibrillary acidic protein (GFAP), endothelial antigen AMVB1, and non-specific mouse IgG immediately after their synthesis and at various time points after intravenous administration to rats with experimental C6 glioma. Their stability was determined in the samples of blood, brain, liver, spleen, and kidney by precipitation with trichloroacetic acid. Electrophoretic analysis, thin-layer chromatography, and immunohistochemical tests have proved the radiochemical purity, immunochemical competence, and stability of the labeled antibodies *in vivo*.

**Key words:** C6 glioma, biodegradation, radio labeled antibodies, monoclonal antibodies.