

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ БЫСТРОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОРЕАКТИВНОЙ ФРАКЦИИ VHH-АНТИТЕЛ ПРОТИВ PD-L1, МЕЧЕННЫХ ^{68}Ga

DOI: 10.17691/stm2023.15.3.03

УДК 575:537.612

Поступила 19.12.2022 г.



К.О. Авров, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;

С.В. Шатик, к.б.н., зав. отделением циклотронных радиофармпрепаратов¹;

В.В. Зайцев, руководитель группы синтеза РФП, ведущий технолог отделения циклотронных радиофармпрепаратов¹;

Р.И. Аль-Шехадат, к.б.н., генеральный директор²;

О.А. Шашкова, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;

Л.А. Терехина, научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;

И.С. Малахов, старший научный сотрудник лаборатории гибридной технологии¹;

М.П. Самойлович, д.б.н., главный научный сотрудник^{1, 3}; руководитель лаборатории гибридной технологии¹

¹Российский научный центр радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова
Министерства здравоохранения РФ, ул. Ленинградская, 70, Санкт-Петербург, поселок Песочный, 197758;

²ООО «Иннова плюс», ул. Калинина, 13, лит. А, помещение 18-Н, Санкт-Петербург, 197198;

³Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская набережная, 7/9,
Санкт-Петербург, 199034

Количественное определение иммунореактивной фракции (ИРФ) меченных радиоактивными изотопами антител или их фрагментов необходимо для оценки специфической активности радиофармпрепаратов. Для этого традиционно используют клетки, экспрессирующие на своей поверхности молекулы-мишени, однако такой анализ занимает много времени и имеет проблемы со стандартизацией.

Цель исследования — разработать быстрый и надежный метод количественного определения ИРФ меченных ^{68}Ga VHH-антител к PD-L1, основанный на использовании магнитных частиц, покрытых молекулами антигена.

Материалы и методы. Мы использовали магнитные частицы, покрытые протеином А. На частицах иммобилизовывали антиген, конъюгированный с Fc-фрагментом (PD-L1-Fc). Определение значения ИРФ меченных радионуклидом ^{68}Ga наноантител (VHH) против PD-L1 (^{68}Ga -VHH-PD-L1) проводили как при помощи магнитных частиц, покрытых молекулами антигена, так и с использованием клеток, экспрессирующих антиген на своей поверхности. При конъюгации VHH-антител с радионуклидом ^{68}Ga молекулы белков модифицировали бифункциональными хелатирующими агентами: тетраазациклодекантетрауксусной кислотой (DOTA) или дефероксаминном (ДФО). Величину ИРФ определяли как отношение радиоактивности, специфически связанной с частицами или клетками, к общей радиоактивности, добавленной в пробу.

Результаты. Доказана специфичность связывания радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1 с магнитными частицами, покрытыми антигеном. Установлены особенности метода, которые необходимо учитывать при его использовании. Проведенное исследование не выявило существенных различий при оценке ИРФ с помощью клеток, экспрессирующих антиген, и с помощью магнитных частиц. При этом использование магнитных частиц с иммобилизованными молекулами антигена позволяет провести определение

Для контактов: Авров Кирилл Олегович, e-mail: kirillavrov@hotmail.com

ИРФ радиоиммуноконъюгата за 15 мин, что имеет принципиальное значение для рутинной оценки специфичности радиофармпрепаратов, содержащих короткоживущие изотопы.

Ключевые слова: магнитные частицы; иммунореактивная фракция; радиоиммуноконъюгат; VHH-антитела.

Как цитировать: Avrov K.O., Shatik S.V., Zaitsev V.V., Al-Shehadat R.I., Shashkova O.A., Terekhina L.A., Malakhov I.S., Samoylovich M.P. Application of magnetic particles for fast determination of immunoreactive fraction of ^{68}Ga -labelled VHH antibodies to PD-L1. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2023; 15(3): 26, <https://doi.org/10.17691/stm2023.15.3.03>

English

Application of Magnetic Particles for Fast Determination of Immunoreactive Fraction of ^{68}Ga -Labelled VHH Antibodies to PD-L1

K.O. Avrov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Hybridome Technology¹;
S.V. Shatik, PhD, Head of the Department of Cyclotron-Produced Radiopharmaceuticals¹;
V.V. Zaitsev, Head of the Group for Radiopharmaceuticals Synthesis, Leading Technologist, Department of Cyclotron-Produced Radiopharmaceuticals¹;
R.I. Al-Shehadat, PhD, General Director²;
O.A. Shashkova, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Hybridome Technology¹;
L.A. Terekhina, Researcher, Laboratory of Hybridome Technology¹;
I.S. Malakhov, Senior Researcher, Laboratory of Hybridome Technology¹;
M.P. Samoylovich, DSc, Chief Researcher^{1, 3}; Head of the Laboratory of Hybridome Technology¹

¹A.M. Granov Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies of the Ministry of Health of the Russian Federation, 70 Leningradskaya St., Saint Petersburg, Pesochniy Settlement, 197758, Russia;

²Innova plus LLC, 13 Kalinina St., Lit. A, Office 18-N, Saint Petersburg, 197198, Russia;

³Saint Petersburg State University, 7/9 Universitetskaya Naberezhnaya St., Saint Petersburg, 199034, Russia

Quantification of the immunoreactive fraction (IRF) of radioactive isotope-labeled antibodies or their fragments is necessary to assess the specific activity of radiopharmaceuticals. Traditionally, cells expressing the target molecules on their surface are used to determine IRF, but such analysis is time-consuming and has difficulties with standardization.

The aim of the study was to develop a fast and reliable method for quantitative determination of IRF by ^{68}Ga -labeled VHH antibodies to PD-L1 based on the use of magnetic particles coated with antigen molecules.

Materials and Methods. Commercially available magnetic particles coated with protein A have been used in our study. The antigen conjugated with the Fc fragment (PD-L1-Fc) was immobilized on the particles. The IRF value of ^{68}Ga radionuclide-labeled nanobodies (VHH) against PD-L1 (^{68}Ga -VHH-PD-L1) was determined using magnetic particles coated with antigen molecules and cells expressing the antigen on their surface. When VHH antibodies were conjugated to ^{68}Ga radionuclide, protein molecules were modified using bifunctional chelating agents: tetraazacyclododecanetetraacetic acid (DOTA) or deferoxamine (DFO). The magnitude of IRF was defined as the ratio of radioactivity specifically bound to particles or cells to the total radioactivity added to the sample.

Results. The specificity of the ^{68}Ga -VHH-PD-L1 radioimmunoconjugate binding to the antigen-coated magnetic particles has been proved. Some special aspects, which should be taken into consideration when using this method, have been established. The comparison of the IRF estimates using the antigen-expressing cells and magnetic particles has not revealed any significant differences in the results obtained in our study. Nevertheless, the presented method based on magnetic particles with immobilized antigen molecules requires only 15 min to determine the radioimmunoconjugate IRF, which is of fundamental importance for the routine assessment of the specificity of radiopharmaceuticals containing short-lived isotopes.

Key words: magnetic particles; immunoreactive fraction; radioimmunoconjugate; VHH antibodies.

Введение

Радиоиммуноконъюгаты, созданные на основе антител или их фрагментов, используют для диагностики и терапии опухолевых заболеваний с целью адресной доставки радионуклидов к клеткам, имеющим на своей поверхности соответствующие антигены. Однако мечение радионуклидами может

снижать антигенсвязывающую способность макромолекул [1]. Следовательно, при изготовлении таких радиофармпрепаратов необходима оценка специфической активности. Для этого определяют значение иммунореактивной фракции (ИРФ) — отношение радиоактивности меченых молекул, способных к специфическому связыванию с антигеном, к общей радиоактивности меченых молекул

радиоиммуноконъюгата. Традиционно проводят инкубацию радиоиммуноконъюгатов с опухолевыми клетками, экспрессирующими на своей поверхности молекулы-мишени [1–6]. Такой подход связан с рядом ограничений и недостатков. Так, уровень экспрессии антигена клетками может быть недостаточен для определения значения ИРФ радиоиммуноконъюгата [7–10]. Кроме того, исследование при помощи клеток занимает много времени, что критично при использовании препарата, содержащего радионуклид с коротким периодом полураспада. Есть проблемы, затрудняющие стандартизацию применения клеток для определения ИРФ: клетки могут экспрессировать разные изоформы молекул-мишеней; уровень экспрессии антигена в этих клетках меняется с течением времени при их пассировании [10–12].

К настоящему времени опубликованы многочисленные работы, в которых специфическую активность радиоиммуноконъюгатов моноклональных антител изучали при помощи магнитных частиц, покрытых иммобилизованными молекулами антигена [10, 13–15]. Мы впервые определили условия использования этого метода для оценки специфической активности меченных радионуклидом VHH-антител (наноантител). В представленной работе магнитные частицы применяли для определения ИРФ меченных изотопом ^{68}Ga препаратов наноантител против белка PD-L1, разработанных совместно Российским научным центром радиологии и хирургических технологий им. академика А.М. Гранова Министерства здравоохранения РФ и ООО «Иннова плюс».

PD-L1, лиганд рецептора программируемой клеточной гибели PD-1, является одним из белков иммунных контрольных точек. Этот трансмембранный белок играет важную роль в ингибировании опосредованного T-клетками иммунного ответа [16, 17]. PD-L1 экспрессируется на антигенпрезентирующих и опухолевых клетках [16, 18], что связано с плохим прогнозом и повышенной смертностью от различных раковых заболеваний [19, 20]. PD-L1 используется как биомаркер при лечении опухолей, включая меланому, рак легких, рак молочной железы, рак почки и другие [18, 21]. В последнее время опубликовано много работ, в которых исследуется применение радиоиммуноконъюгатов с антителами против PD-L1 для терапии и диагностики рака, в том числе работы с VHH-антителами, мечеными ^{68}Ga [22–25]. Оценку ИРФ этих препаратов, используемых в позитронно-эмиссионной томографии, авторы проводили по методу T. Lindmo [1]. Для этого применяли опухолевые генно-модифицированные клетки человека A375-hPD-L1 с повышенным уровнем экспрессии рекомбинантного белка PD-L1 [22]. Однако радионуклид ^{68}Ga имеет период полураспада 68 мин, что слишком мало для определения ИРФ таких препаратов при помощи клеток. Для клинического применения радиоиммуноконъюгатов, содержащих ^{68}Ga , необходим более быстрый метод оценки их специфической активности.

Цель исследования — разработать быстрый и надежный метод количественного определения ИРФ меченных ^{68}Ga VHH-антител к PD-L1, основанный на использовании магнитных частиц, покрытых молекулами антигена.

Материалы и методы

Мечение VHH-антител радионуклидом ^{68}Ga . При конъюгации VHH-антител (ООО «Иннова плюс», Россия) с радионуклидом ^{68}Ga молекулы белков модифицировали, используя бифункциональные хелатирующие агенты (БХА): тетраазациклододекантетрауксусную кислоту (DOTA, изотиоцианатное производное) или дефероксамин (ДФО, этилсквартанное производное). Эти хелаторы присоединяли к белковым молекулам по первичным аминогруппам путем инкубации 1–2 мг белка в 50 мМ боратном или натрий-карбонатном буфере (рН=8,5–8,8) с 10-кратным молярным избытком БХА в течение 17 ч при комнатной температуре. Модифицированные белки отделяли гель-фильтрационной хроматографией в 50 мМ аммоний-ацетатном буферном растворе (рН=7,5), целевую фракцию концентрировали ультрафильтрацией. Для мечения белков ^{68}Ga в микропробирку помещали 100 мкг модифицированного белка, добавляли 50 мкл раствора $[\text{}^{68}\text{Ga}]\text{GaCl}_3$ в 0,1 М HCl, полученного при элюировании генератора галлия-68 (ЗАО «Циклотрон», Россия), и 150 мкл 50 мМ аммоний-ацетатного буферного раствора (рН=7,5). При мечении VHH-антител, модифицированных ДФО, реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин в присутствии воздуха и перемешивали в термошейкере (1000 об./мин). При мечении VHH-антител, модифицированных DOTA, реакционную смесь инкубировали при тех же условиях, за исключением температуры, которую повышали до 60–70°C. Включение радионуклидов в белковые молекулы превышало 95%.

Определение ИРФ радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1 с использованием магнитных частиц. Для оценки ИРФ радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1 применяли коммерчески доступные магнитные частицы диаметром 2,4–3,4 мкм, покрытые протеином А (Bio-Rad, США), кат. №161-4013. Для работы с частицами использовали магнитный штатив (ООО «НПФ Хеликон», Россия). Центрифужную пробирку с частицами вынимали из магнитного штатива перед добавлением новой порции раствора и устанавливали обратно перед его удалением.

Для иммобилизации на магнитных частицах антигена, конъюгированного с Fc-фрагментом (PD-L1-Fc), 200 мкл суспензии магнитных частиц помещали в закрепленную в магнитном штативе центрифужную пробирку объемом 1,5 мл, раствор удаляли. Затем частицы промывали в 1 мл раствора, содержащего 50 мМ NaCl, 50 мМ трис-HCl, 0,05% твин-20 (рН=7,6) — ТБСТ. Частицы инкубировали в течение 15 мин с 1 мл

раствора PD-L1-Fc в ТБСТ (10 мкг/мл). Инкубацию проводили на роторной мешалке при 15 об./мин. Для определения неспецифического связывания готовили частицы, не покрытые антигеном. При этом вместо раствора PD-L1-Fc к частицам добавляли ТБСТ. Далее частицы промывали в 1 мл раствора ТБСТ, содержащего 1% бычий сывороточный альбумин (БСА), затем инкубировали в этом растворе в течение 5 мин, после чего раствор удаляли и добавляли 200 мкл ТБСТ-БСА.

В процессе определения ИРФ к 10 мкл суспензии частиц добавляли по 50 мкл раствора радиоиммунконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ из серии разведений в ТБСТ с различной концентрацией и объемной активностью радиоиммунконъюгата. Последний добавляли как к частицам, покрытым антигеном, так и к частицам без антигена (для определения неспецифического связывания). После инкубации в течение 15 мин пробы промывали три раза ТБСТ, затем измеряли величину радиоактивности проб, используя радиометр активности радионуклидов Triathler (Hidex Oy, Финляндия). Величину радиоактивности молекул $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$, специфически связавшихся с магнитными частицами (B), покрытыми молекулами антигена, определяли по формуле:

$$B=A-N,$$

где A — величина радиоактивности, связавшейся с покрытыми PD-L1 частицами; N — величина радиоактивности, связавшейся с магнитными частицами, не покрытыми молекулами антигена. Значения ИРФ рассчитывали по формуле:

$$\text{ИРФ} = B/T \cdot 100\%,$$

где T — величина общей радиоактивности, добавленной в пробу.

Для определения ИРФ строили график зависимости величины отношения B/T от концентрации радиоиммунконъюгата в пробе. ИРФ устанавливали по пробе, имеющей максимальное значение величины B/T .

Неспецифическое связывание также определяли добавлением в пробу с частицами, покрытыми антигеном, немеченых молекул VNH-PD-L1 (метод блокирования). Немеченые VNH-антитела добавляли в пробу за 1 мин перед добавлением радиоиммунконъюгата в концентрации, не менее чем в 200 раз превышавшей концентрацию последнего. После инкубации пробы отмывали от несвязавшейся радиоактивности, как описано выше.

Все измеренные значения радиоактивности пересчитывали для времени измерения первого образца (нулевой временной точки) по формуле:

$$A_0 = A_t \cdot e^{\lambda t},$$

где A_0 — радиоактивность образца в нулевой точке, A_t — радиоактивность образца, измеренная через t минут после начала измерения (измерения перво-

го образца), λ — постоянная распада изотопа ^{68}Ga (0,010237).

Определение ИРФ радиоиммунконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ с помощью клеток СТ26-PD-L1 *in vitro*. Численные значения ИРФ радиоиммунконъюгатов определяли по методу, основанному на использовании постоянного количества меченных радионуклидом антител и переменного количества антигена (клеток) [1]. Клетки СТ26-PD-L1 были получены в нашей лаборатории методами генной инженерии из клеток мышинной аденокарциномы линии СТ26 и экспрессировали на своей поверхности в среднем по 1,5 млн молекул PD-L1 человека. Использовали клетки, которые снимали с поверхности флаконов, или клетки, которые *ex tempore* размораживали после криоконсервации. В обоих вариантах клетки суспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБР), содержащем 1% БСА и 0,05% азида натрия. Количество клеток определяли с помощью кондуктометрического счетчика Z1 (Beckman Coulter, США) и оценивали жизнеспособность, используя раствор трипанового синего («БиолоТ», Россия). Все процедуры проводили при 4°C. Клеточные суспензии с прогрессивно убывающей концентрацией клеток распределяли по пробиркам Эппендорфа, затем во все пробирки вносили одинаковое количество меченых VNH-антител. Пробирки с максимальным количеством клеток содержали 4,0 млн, а с минимальным — 0,0625 млн клеток. Образцы клеток инкубировали в течение 1 ч в растворах меченых антител, периодически суспендируя с помощью мешалки Vortex (VELP Scientifica, Италия), чтобы предотвратить оседание клеток. Затем трижды отмывали от несвязавшихся антител в ФСБР путем центрифугирования. Радиоактивность проб выявляли с помощью радиометра активности радионуклидов Triathler (Hidex Oy, Финляндия). Для определения неспецифического связывания пробы предварительно инкубировали с немечеными одноименными антителами, взятыми в 100-кратном избытке по сравнению с концентрацией меченых радионуклидом антител. Численное значение ИРФ в процентах устанавливали по пробе, в которой достигнуто максимальное значение специфического связывания всех меченых VNH-антител с молекулами-мишенями, экспрессированными на поверхности клеток. Дальнейшее увеличение содержания клеток в пробе при той же концентрации радиоиммунконъюгата не приводило к увеличению специфического связывания; это свидетельствовало о том, что все интактные меченые VNH специфически связались с клетками.

Статистическая обработка данных. Все результаты получены не менее чем в трех повторах. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с использованием пакета программ Statistica 10.0. Данные представлены как $M \pm SD$, где M — среднее, а SD — стандартное отклонение. Наличие статистических различий оценивали попарным сравнением независимых выборок с

использованием критерия Манна–Уитни; статистически значимыми считали различия с уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Перед исследованием стояли следующие задачи: оценить возможность применения магнитных частиц для определения ИРФ радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$, установить оптимальные условия анализа при использовании этого метода, а также сравнить его с традиционной инкубацией при помощи клеток.

Для проверки специфичности связывания радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами использовали два подхода: блокирование связывания радиоиммуноконъюгата с покрытыми антигеном частицами избытком немеченых VNH и связывание радиоиммуноконъюгата с частицами, не покрытыми молекулами антигена (рис. 1).

Данные рис. 1 демонстрируют, что связывание радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ с магнитными частицами в пробе эффективно блокировалось присутствием высокой концентрации немеченых VNH против PD-L1. Столь же низким было неспецифическое связывание и при отсутствии молекул антигена на поверхности частиц. Это доказывает специфичность связывания радиоиммуноконъюгата с частицами, несущими антиген, а также правомерность использования

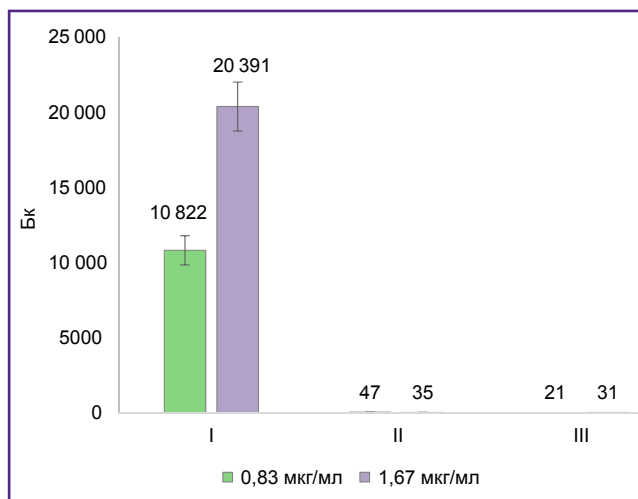


Рис. 1. Определение специфического и неспецифического связывания радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ с магнитными частицами:

I — связывание радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами, покрытыми молекулами антигена; II — связывание радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами, покрытыми молекулами антигена, в присутствии высокой концентрации немеченых VNH; III — связывание радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами, не покрытыми молекулами антигена. Цифры на графике показывают значение радиоактивности проб. В легенде указана концентрация радиоиммуноконъюгата

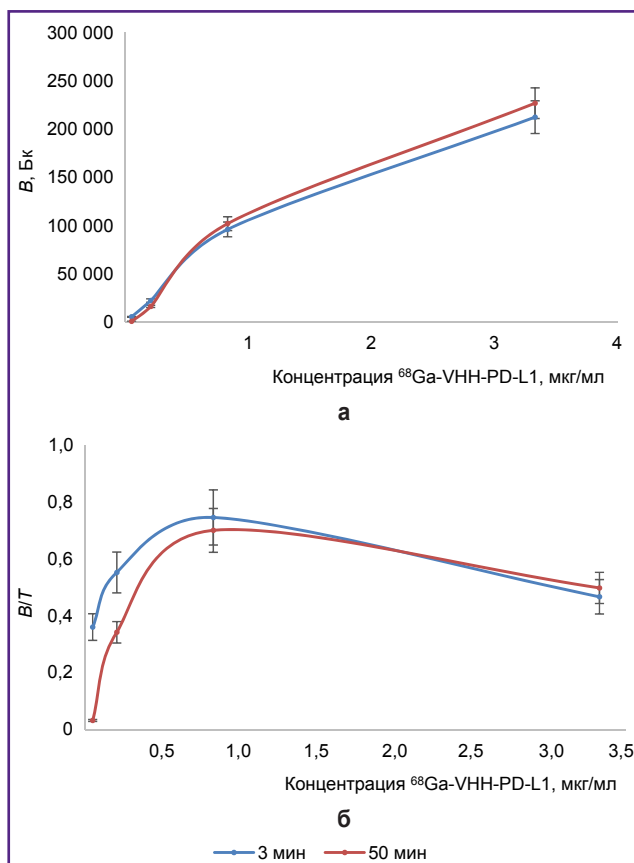


Рис. 2. Влияние времени инкубации на специфическое связывание радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ с магнитными частицами, покрытыми антигеном (а), и на величину отношения B/T (б)

Здесь и далее: B — величина радиоактивности молекул $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$, специфически связавшихся с магнитными частицами, покрытыми молекулами антигена; T — величина общей радиоактивности, добавленной в пробу. В легенде указано время инкубации радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами

частиц без антигена для измерения неспецифического связывания. Необходимо отметить, что во всех представленных в данной работе опытах уровень неспецифического связывания не превышал 1% от общего.

Результаты определения зависимости измеренной величины ИРФ радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ от времени его инкубации с магнитными частицами приведены на рис. 2.

Время инкубации радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ с магнитными частицами, покрытыми антигеном, не имело существенного влияния на величину специфического связывания (рис. 2, а). Величина отношения B/T также практически не зависела от времени инкубации (рис. 2, б). Таким образом, для тестирования радиофармпрепарата достаточно трехминутной инкубации, что является принципиально важным при использовании короткоживущих изотопов. При инкубации частиц с радиоиммуноконъюгатом в течение 3 мин весь анализ, включая измерение

радиоактивности в пробах, занимает не более 15 мин. Это позволяет проводить быструю оценку специфической активности радиоиммуноконъюгатов, содержащих короткоживущие изотопы, такие как ^{68}Ga с периодом полураспада 68 мин. Необходимо отметить, что определение ИРФ радиоиммуноконъюгатов при помощи традиционно используемых для этой цели клеток занимает более двух часов. Это делает невозможным дальнейшее использование радиоиммуноконъюгатов, содержащих короткоживущие изотопы, в качестве радиофармпрепаратов.

При высоких (3,33 мкг/мл) значениях концентрации радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1 в пробе происходило снижение величины B/T по сравнению с его максимальным значением, достигнутым при концентрации 0,83 мкг/мл. Это объясняется избытком меченых VHH-антител по отношению к иммобилизованному на частицах антигену. При этом важно отметить, что инкубация покрытых антигеном частиц с радиоиммуноконъюгатом в концентрации ниже 0,83 мкг/мл также приводила к уменьшению значения B/T . Полученные результаты демонстрируют, что для измерения максимальной величины B/T необходимо экспериментально подбирать отношение концентрации радиоиммуноконъюгата к концентрации магнитных частиц в пробе. Это позволит количественно оценить ИРФ радиоиммуноконъюгата.

Для того чтобы проверить последнее утверждение, мы провели эксперимент, в котором инкубировали радиоиммуноконъюгат с разным количеством магнитных частиц в пробах (рис. 3). В пробы добавляли суспензии частиц с иммобилизованным антигеном в объеме 2,5, 5, 10 и 20 мкл. Аналогично для определения неспецифического связывания готовили ряд проб с такими же количествами частиц без антигена. К пробам добавляли TBS-T с 1% БСА, чтобы суммарный объем раствора в пробе был 20 мкл. После этого во все пробы добавляли по 50 мкл раствора, содер-

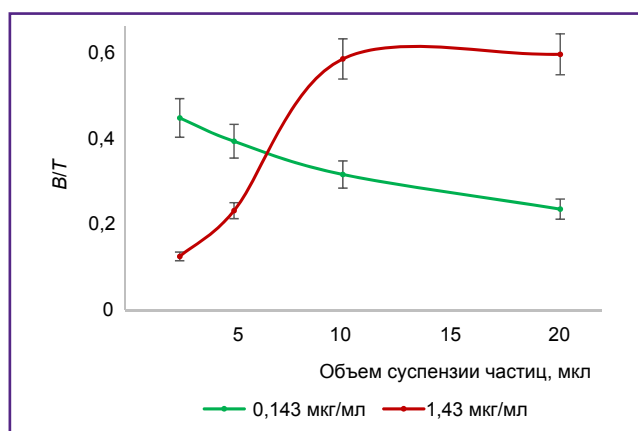


Рис. 3. Зависимость величины B/T от количества магнитных частиц в пробе

В легенде указана концентрация радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1

жащего ^{68}Ga -VHH-PD-L1 в концентрации 1,43 или 0,143 мкг/мл. Далее эксперимент проводили так, как описано в «Материалах и методах».

При связывании радиоиммуноконъюгата, взятого в концентрации 1,43 мкг/мл, с разным количеством магнитных частиц, покрытых молекулами антигена, график насыщения достигает плато при достижении избытка молекул антигена в пробе относительно меченых молекул VHH (см. рис. 3). Однако, если концентрация радиоиммуноконъюгата в 10 раз меньше (0,143 мкг/мл), величина отношения B/T уменьшается при увеличении содержания частиц в пробе. Это происходит несмотря на заведомо избыточное количество молекул иммобилизованного на частицах антигена по отношению к меченому молекулам VHH. Полученные результаты подтверждают сделанное ранее заключение, что для измерения ИРФ необходимо определенное соотношение концентраций радиоиммуноконъюгата и магнитных частиц, несущих антиген. Следовательно, оценка ИРФ радиоиммуноконъюгата требует приготовления достаточного числа проб с разными концентрациями меченых антител для выявления максимальной величины отношения B/T . S.K. Sharma и соавт. [10] с целью определения ИРФ радиоиммуноконъюгатов проводили одноточечный анализ для одной концентрации меченых антител с большим избытком молекул антигена, иммобилизованных на магнитных частицах. Приведенные в нашей работе данные указывают, что подобный подход не гарантирует получения адекватных результатов анализа. В других работах [13–15] для определения ИРФ инкубировали меченые антитела одной концентрации с разным количеством покрытых антигеном магнитных частиц. Однако, как видно на рис. 3, такой подход также может приводить к ошибочной оценке ИРФ, поскольку из-за условий эксперимента сложно использовать достаточно широкий диапазон концентраций таких частиц.

Для определения ИРФ радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1 применяли магнитные частицы, предварительно покрытые молекулами антигена. Была проведена оценка срока годности частиц с иммобилизованным антигеном при хранении от 4–8°C (рис. 4).

Представленные на рис. 4 данные показывают, что хранение частиц с иммобилизованными молекулами антигена в течение 3 сут не приводит к снижению измеренной величины ИРФ радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1. Однако в дальнейшем происходит падение значения данного показателя с 78,5 до 61,1% после хранения частиц в течение 9 сут и до 37,6% — после хранения в течение 43 сут. Таким образом, после иммобилизации молекул антигена магнитные частицы остаются пригодными для измерения ИРФ по крайней мере в течение 3 сут.

В настоящей работе выполнено сравнение величин ИРФ одного образца радиоиммуноконъюгата ^{68}Ga -VHH-PD-L1, измеренных с использованием магнитных частиц и при помощи клеток, экспрессирующих

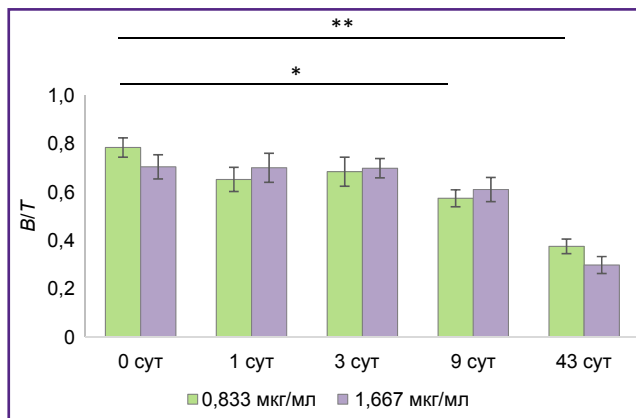


Рис. 4. Отношение B/T, измеренное через 0, 1, 3, 9 и 43 сут после иммобилизации молекул антигена на магнитных частицах
 В легенде указана концентрация радиоиммуноконъюгата ⁶⁸Ga-VHH-PD-L1; * p<0,05; ** p<0,01

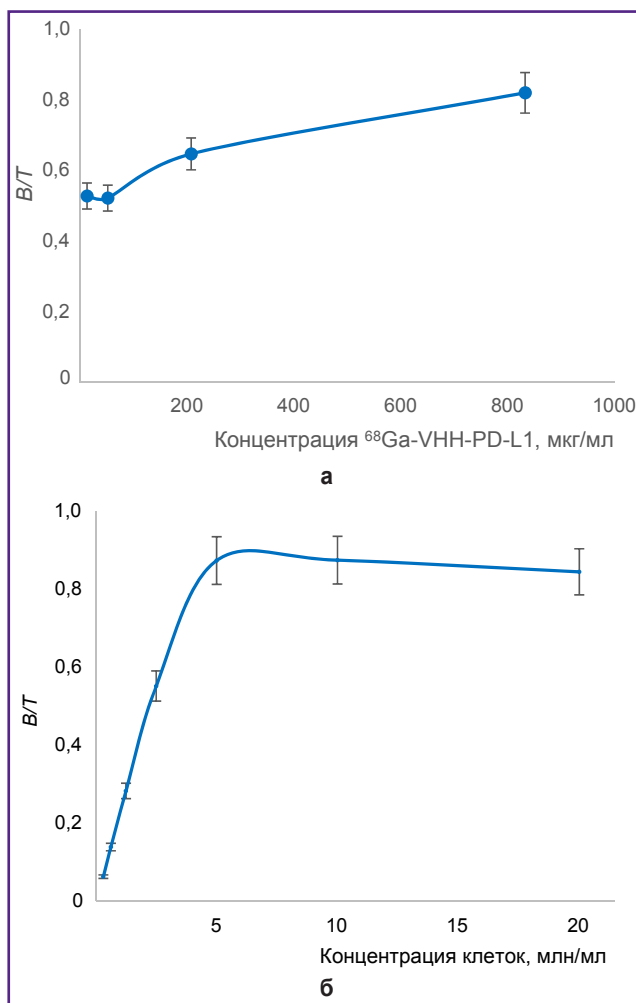


Рис. 5. Определение величины иммунореактивной фракции радиоиммуноконъюгата ⁶⁸Ga-VHH-PD-L1 двумя методами:
 а — путем инкубации радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами; б — путем инкубации радиоиммуноконъюгата с клетками СТ26-PD-L1

тот же антиген на своей поверхности (рис. 5). Проведение такого исследования является особенно важным, поскольку иммобилизация белкового антигена на частицах может приводить к изменению его конформации и влиять на связывание с антителами [26].

Среднее значение величин ИРФ, определенных путем связывания радиоиммуноконъюгата с магнитными частицами и с клетками СТ26-PD-L, составило 81,2 и 87,5% соответственно (см. рис. 5). Эти значения сопоставимы, что свидетельствует об адекватности использования представленного в данной работе метода для оценки специфической активности радиоиммуноконъюгатов. Радиоиммуноконъюгат сохраняет сродство к иммобилизованному на частицах молекулам PD-L1, несмотря на то, что их конформация может отличаться от нативной конформации молекул PD-L1, экспрессированных на поверхности клеток. Также сохраняется стерическая доступность для сайтов связывания иммобилизованного антигена и радиоиммуноконъюгата.

Мы использовали магнитные частицы для сравнительных исследований радиоиммуноконъюгатов, приготовленных с помощью разных методик. В качестве хелатирующих предшественников для мечения радионуклидом ⁶⁸Ga применяли DOTA-VHH-PD-L1 и DFO-Sq-VHH-PD-L1 (рис. 6). По данным эксперимента, значение ИРФ радиоиммуноконъюгата ⁶⁸Ga-VHH-PD-L1, содержащего хелатор DFO-Sq, составляет 75,1%, в то время как аналогичный радиоиммуноконъюгат, который получен мечением VHH, модифицированного хелатором DOTA, имеет значение ИРФ, равное 59,7%. Это значит, что использование DFO-Sq вместо DOTA позволяет увеличить долю неповрежденных меченых VHH.

По результатам данного эксперимента была поставлена задача найти условия мечения VHH-антител радионуклидом ⁶⁸Ga при использовании хелатора DOTA,

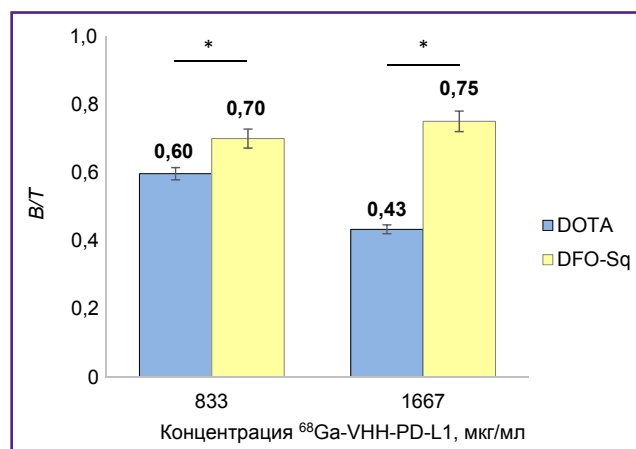


Рис. 6. Сравнение величин отношения B/T, измеренных для радиоиммуноконъюгатов ⁶⁸Ga-VHH-PD-L1, меченых с использованием хелатирующих предшественников DOTA-VHH-PD-L1 и DFO-Sq-VHH-PD-L1
 * p<0,05

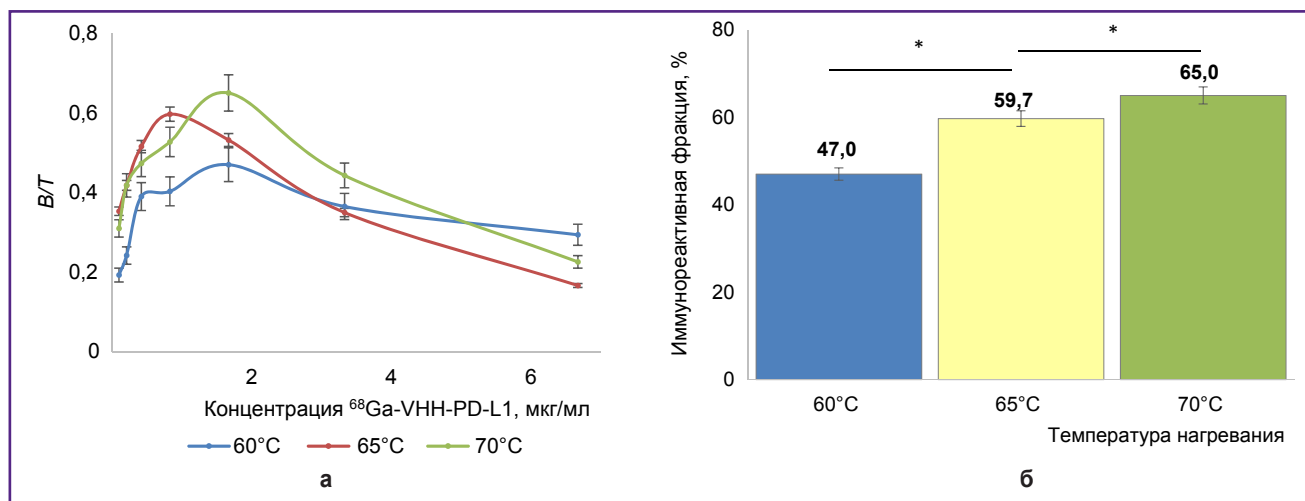


Рис. 7. Влияние температуры реакционной смеси на величину иммунореактивной фракции радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$, содержащего хелатор DOTA:

а — зависимость величины *B/T* от концентрации радиоиммуноконъюгата; *б* — величина измеренной иммунореактивной фракции радиоиммуноконъюгата, полученного при разных температурах реакционной смеси; * $p < 0,05$

позволяющие увеличить ИРФ радиофармпрепарата. При мечении VNH-антител радионуклидом ^{68}Ga реакционную смесь нагревали до 60, 65 или 70°C. Затем при помощи магнитных частиц определяли ИРФ полученного радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ (рис. 7).

Данные рис. 7 показывают, что повышение температуры нагревания при получении радиоиммуноконъюгата способствовало увеличению значения ИРФ. Так, при нагревании до 60°C среднее значение ИРФ было равно 47,0%, при нагревании до 65°C — 59,7%, а при нагревании до 70°C — 65,0%. Очевидно, что нагревание реакционной смеси до 70°C приводит к получению радиоиммуноконъюгата с более высоким значением ИРФ, чем нагревание до более низких температур. Причины подобного эффекта пока неясны.

Приведенные выше результаты показывают, что применение магнитных частиц с иммобилизованными на их поверхности молекулами антигена позволяет определить оптимальные условия мечения VNH против PD-L1 радионуклидом ^{68}Ga .

В настоящей работе продемонстрировано, что при оценке специфической активности радиоиммуноконъюгата $^{68}\text{Ga-VNH-PD-L1}$ магнитные частицы, покрытые антигеном PD-L1, способны заменить клетки, экспрессирующие PD-L1 на своей поверхности. В дальнейшем необходимо изучить возможность применения представленного в данной работе метода для определения ИРФ других радиоиммуноконъюгатов, изготовленных как на основе VNH-антител, так и с использованием других антигенсвязывающих молекул. Очевидны два направления работы для усовершенствования метода: желательным будет увеличение срока годности покрытых антигеном магнитных частиц с трех до как минимум семи дней, а также расширить

диапазон концентраций радиоиммуноконъюгата в пробе, приемлемых для проведения измерения.

Заключение

Использование магнитных частиц, покрытых иммобилизованными молекулами антигена, позволяет провести определение иммунореактивной фракции VNH-антител против PD-L1, меченных ^{68}Ga , в течение 15 мин. Полученные результаты показывают, что этот метод имеет реальную практическую ценность для измерения специфической активности радиоиммуноконъюгатов *in vitro*, поскольку проведение анализа становится более доступным и надежным, чем при использовании клеток. Особенно важно, что применение магнитных частиц открывает возможность быстрой рутинной оценки радиофармпрепаратов, содержащих короткоживущие изотопы.

Финансирование исследования. Работа выполнена в рамках госзадания Министерства здравоохранения РФ.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

- Lindmo T., Boven E., Cuttitta F., Fedorko J., Bunn P.A. Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984; 72(1): 77–89, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90435-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90435-6).
- Bian H.J., Chen Z.N., Deng J.L. Direct technetium-99m labeling of anti-hepatoma monoclonal antibody fragment: a radioimmunoconjugate for hepatocellular carcinoma imaging. *World J Gastroenterol* 2000; 6(3): 348–352, <https://doi.org/10.3748/wjg.v6.i3.348>.

3. Burvenich I.J., Parakh S., Gan H.K., Lee F.T., Guo N., Rigopoulos A., Lee S.T., Gong S., O'Keefe G.J., Tochon-Danguy H., Kotsuma M., Hasegawa J., Senaldi G., Scott A.M. Molecular imaging and quantitation of EphA2 expression in xenograft models with ⁸⁹Zr-DS-8895a. *J Nucl Med* 2016; 57(6): 974–980, <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.169839>.
4. Kristensen L.K., Fröhlich C., Christensen C., Melander M.C., Poulsen T.T., Galler G.R., Lantto J., Horak I.D., Kragh M., Nielsen C.H., Kjaer A. CD4⁺ and CD8a⁺ PET imaging predicts response to novel PD-1 checkpoint inhibitor: studies of Sym021 in syngeneic mouse cancer models. *Theranostics* 2019; 9(26): 8221–8238, <https://doi.org/10.7150/thno.37513>.
5. Pruszynski M., D'Huyvetter M., Bruchertseifer F., Morgenstern A., Lahoutte T. Evaluation of an anti-HER2 nanobody labeled with ²²⁵Ac for targeted α -particle therapy of cancer. *Mol Pharm* 2018; 15(4): 1457–1466, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00985>.
6. Bellaye P.S., Moreau M., Raguin O., Oudot A., Bernhard C., Vigneaude J.M., Dumont L., Vandroux D., Denat F., Cochet A., Brunotte F., Collin B. Radiolabeled F(ab')₂-cetuximab for theranostic purposes in colorectal and skin tumor-bearing mice models. *Clin Transl Oncol* 2018; 20(12): 1557–1570, <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1886-4>.
7. Mattes M.J. Limitations of the Lindmo method in determining antibody immunoreactivity. *Int J Cancer* 1995; 61(2): 286–288, <https://doi.org/10.1002/ijc.2910610224>.
8. Dux R., Kindler-Röhrborn A., Lennartz K., Rajewsky M.F. Determination of immunoreactive fraction and kinetic parameters of a radiolabeled monoclonal antibody in the absence of antigen excess. *J Immunol Methods* 1991; 144(2): 175–183, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90084-s](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90084-s).
9. Konishi S., Hamacher K., Vallabhajosula S., Kothari P., Bastidas D., Bander N., Goldsmith S. Determination of immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies: what is an appropriate method? *Cancer Biother Radiopharm* 2004; 19(6): 706–715, <https://doi.org/10.1089/cbr.2004.19.706>.
10. Sharma S.K., Lyashchenko S.K., Park H.A., Pillarsetty N., Roux Y., Wu J., Poty S., Tully K.M., Poirier J.T., Lewis J.S. A rapid bead-based radioligand binding assay for the determination of target-binding fraction and quality control of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol* 2019; 71: 32–38, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2019.04.005>.
11. Vu T.N., Wills Q.F., Kalari K.R., Niu N., Wang L., Pawitan Y., Rantalainen M. Isoform-level gene expression patterns in single-cell RNA-sequencing data. *Bioinformatics* 2018; 34(14): 2392–2400, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty100>.
12. Mouriaux F., Zaniolo K., Bergeron M.A., Weidmann C., De La Fouchardière A., Fournier F., Droit A., Morcos M.W., Landreville S., Guérin S.L. Effects of long-term serial passaging on the characteristics and properties of cell lines derived from uveal melanoma primary tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57(13): 5288–5301, <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19317>.
13. Zalutsky M.R., Zhao X.G., Alston K.L., Bigner D. High-level production of alpha-particle-emitting (211)At and preparation of (211)At-labeled antibodies for clinical use. *J Nucl Med* 2001; 42(10): 1508–1515.
14. Andersen L. *Development of an analytical method for the determination of the antigen binding capacity of radiolabeled antibodies*. MSc Thesis. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology; 2012.
15. Pirovano G., Ordonez A.A., Jain S.K., Reiner T., Carroll L.S., Pillarsetty N.V.K. Rapid detection of SARS-CoV-2 using a radiolabeled antibody. *Nucl Med Biol* 2021; 98–99: 69–75, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2021.05.002>.
16. Wang X., Teng F., Kong L., Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther* 2016; 9: 5023–5039, <https://doi.org/10.2147/ott.s105862>.
17. Sun C., Mezzadra R., Schumacher T.N. Regulation and function of the PD-L1 checkpoint. *Immunity* 2018; 48(3): 434–452, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.014>.
18. Doroshov D.B., Bhalla S., Beasley M.B., Sholl L.M., Kerr K.M., Gnjatich S., Wistuba I.I., Rimm D.L., Tsao M.S., Hirsch F.R. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol* 2021; 18(6): 345–362, <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00473-5>.
19. Jung H.I., Jeong D., Ji S., Ahn T.S., Bae S.H., Chin S., Chung J.C., Kim H.C., Lee M.S., Baek M.J. Overexpression of PD-L1 and PD-L2 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res Treat* 2017; 49(1): 246–254, <https://doi.org/10.4143/crt.2016.066>.
20. Rezaeeyan H., Hassani S.N., Barati M., Shahjehani M., Saki N. PD-1/PD-L1 as a prognostic factor in leukemia. *J Hematopathol* 2017; 10(1): 17–24, <https://doi.org/10.1007/s12308-017-0293-z>.
21. Núñez Abad M., Calabuig-Fariñas S., Lobo de Mena M., Torres-Martínez S., García González C., García García J.Á., Iranzo González-Cruz V., Camps Herrero C. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) as immunotherapy biomarker in breast cancer. *Cancers (Basel)* 2022; 14(2): 307, <https://doi.org/10.3390/cancers14020307>.
22. Lv G., Sun X., Qiu L., Sun Y., Li K., Liu Q., Zhao Q., Qin S., Lin J. PET imaging of tumor PD-L1 expression with a highly specific nonblocking single-domain antibody. *J Nucl Med* 2020; 61(1): 117–122, <https://doi.org/10.2967/jnumed.119.226712>.
23. Liu Q., Jiang L., Li K., Li H., Lv G., Lin J., Qiu L. Immuno-PET imaging of ⁶⁸Ga-labeled nanobody Nb109 for dynamic monitoring the PD-L1 expression in cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2021; 70(6): 1721–1733, <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02818-y>.
24. Qin S., Yu Y., Guan H., Yang Y., Sun F., Sun Y., Zhu J., Xing L., Yu J., Sun X. A preclinical study: correlation between PD-L1 PET imaging and the prediction of therapy efficacy of MC38 tumor with ⁶⁸Ga-labeled PD-L1 targeted nanobody. *Aging (Albany NY)* 2021; 13(9): 13006–13022, <https://doi.org/10.18632/aging.202981>.
25. Yu S., Xiong G., Zhao S., Tang Y., Tang H., Wang K., Liu H., Lan K., Bi X., Duan S. Nanobodies targeting immune checkpoint molecules for tumor immunotherapy and immunoimaging (review). *Int J Mol Med* 2021; 47(2): 444–454, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4817>.
26. Kumar M., Khan I., Sinha S. Nature of immobilization surface affects antibody specificity to placental alkaline phosphatase. *J Immunoassay Immunochem* 2015; 36(4): 405–413, <https://doi.org/10.1080/15321819.2014.973117>.