

УДК 541(49+64)

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ БЕЛКОВ С ХЕЛАТНЫМИ ПОЛИМЕРАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОДОРАСТВОРIMОГО КАРБОДИИМИДА И N-ГИДРОКСИСУЛЬФОСУКЦИННИМАДА

Клибанов А. Л., Слинкин М. А., Лукьянов А. Н.,
Торчилин В. П.

Получены водорастворимые хелатные полимеры на основе полилизина и диэтилентриаминпентауксусной кислоты. Изучено влияние степени модификации полилизина остатками кислоты на процесс активации хелатных полимеров 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимидом. Развит подход к получению конъюгатов хелатных полимеров с белками, основанный на их активации смесью карбодиимида и N-гидроксисульфосукциниимида. Разработаны оптимальные условия активации.

Модификация моноклональных антител полимерами, содержащими остатки хелатирующих агентов в цепи, может позволить значительно увеличить число атомов металла, связанных с молекулой антитела, без значительной потери иммунологической активности последнего [1, 2]. Решение этой задачи весьма важно для дальнейшего развития радиоиммунодиагностики [3], радиоиммунотерапии [4] и ЯМР-томографии [5]. Конъюгаты указанного типа на основе различных антител, специфичных к компонентам опухолей, тромбов и некротических тканей, могут позволить снизить количество вводимого препарата антител (что особенно существенно для радиоиммунотерапии), повысить концентрацию металла-метки в мишени (что необходимо для ЯМР-томографии) и во много раз ускорить выведение антител из крови [3].

К настоящему времени в нескольких работах уже описано получение таких конъюгатов [1, 2, 6]. В качестве исходного полимера обычно используют полилизин (ПЛ) с $M = (6-14) \cdot 10^3$, который модифицируют циклическим ангидридом диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТПА) по методике, предложенной в работе [7]. Для дальнейшего связывания с антителами в работах [2, 6] оставшиеся свободные аминогруппы ПЛ модифицировали гетеробифункциональным реагентом N-сукциниимиил-3-(2-пиридилдитио)пропионатом (СПДП) либо для введения в полимерную цепь групп SH, либо для образования конъюгата с белком за счет взаимодействия ПДП-остатков с введенными в белок группами SH. Такой подход, однако, требует особого внимания к возможной сшивке макромолекул, содержащих группы SH. В некоторых случаях необходимо также дополнительно вводить группы SH в белковую глобулу.

Нами предложена альтернативная схема получения конъюгата антител с ПЛ — ДТПА, основанная на использовании активированного производного полимера с водорастворимым карбодиимидом — 1-этил-3-(3'-диметиламинопропил)карбодиимидом (ЭДК) [1]. Свободные аминогруппы ПЛ — ДТПА при этом сукцинилируют, так что возможность сшивки молекул полимера между собой исключается.

Для повышения удельной активности мечения тяжелыми металлами с белком через полимер желательно связать возможно большее количество остатков ДТПА. Однако увеличение этого количества приводит к уменьшению выхода связывания полимера с белком. Поэтому в настоящей работе для образцов сукцинилированного ПЛ — ДТПА (ПЛ — ДТПА — С) с различным содержанием ДТПА исследовали эффективность их взаимодей-

ствия с первичными аминогруппами (белка), а также возможность увеличения эффективности связывания первичных аминогрупп активированным полимером при использовании N-гидроксисульфосукцинида (ГССИ).

Использовали следующие вещества: поли-L-лизин гидробромид ($M=14\,000$, 18 000), ЭДК, ДТПА, янтарный ангидрид, этиловый эфир ацетилтироцина (АТЭЭ), триинитробензолсульфокислоту (ТИБС) (все вещества фирмы «Sigma», США), ГССИ («Fluka», Швейцария), α -химотрипсин (ХТ) («Cabiliochem», Англия), метиловый эфир триптофана (МЭТ) («Reanal» Венгрия), $^{59}\text{FeCl}_3$ («Amersham», Англия), $^{111}\text{InCl}_3$ (В/О «Изотоп»). Моноклональные антитела против антигентензинпревращающего фермента (АПФ) любезно предоставлены С. М. Даниловым. Использовали органические растворители и компоненты буферных растворов («Merck», ФРГ). Циклический ангидрид ДТПА получали по методу [7].

Хелатные полимеры (ХП) синтезировали при добавлении к раствору ПЛ в 0,1 м. карбонатном буфере (рН 8,0, концентрация ПЛ 2,5 мг/мл) сначала раствора ангидрида ДТПА в ДМСО, а затем сухого янтарного ангидрида, причем на последней стадии рН раствора постоянно доводили до 8,0 с помощью концентрированного раствора NaOH. Степень модификации аминогрупп ПЛ остатками ДТПА определяли с помощью ТИБС [8], причем для подавления электростатических эффектов полимерной цепи реакцию вели в присутствии 1 м. NaCl.

Полученные полимеры ПЛ – ДТПА – С диализовали против воды, лиофилизовали и растворяли вновь в дистиллированной воде до точно известной весовой концентрации. С целью определения их ММ с помощью ГПХ на «Сефадексе G-100» («Pharmacia», Швеция) их предварительно метили в 0,02 м. цитратном буфере, рН 6,0, следовыми количествами ^{59}Fe или ^{111}In . Для альтернативного определения их степени модификации остатками ДТПА их метили ^{59}Fe в присутствии известного избыточного количества Fe^{3+} . Радиоактивность фракций после хроматографии определяли с помощью гамма-счетчика («Сотригадама», LKB, Швеция).

Эксперименты с модельным амином МЭТ проводили в две стадии [9]: полимеры активировали (только ЭДК или смесь ЭДК и ГССИ) в воде, рН 4,0, в течение 1–20 мин, а затем добавляли МЭТ в 10-кратном недостатке в 0,05 м. боратном буфере, рН 8,5. Количество связавшихся с полимером аминогрупп определяли с помощью ТИБС через 1,5–2 ч после добавления МЭТ.

За процессом активации полимеров в присутствии ЭДК следили по убыли оптической плотности водных растворов полимеров (концентрация 0,25 мг/мл) при 247 нм [9] после добавления к ним ЭДК до концентрации 1,5 мг/мл (спектрофотометр «Yanaco UO 2000», Япония).

При конъюгировании полимеров с белками (ХТ или антителами класса IgG против АПФ) активацию ПЛ – ДТПА – С вели в течение установленного оптимального времени, а количество связанного с белком полимера определяли с помощью ГПХ предварительно меченого образца на «Сефадексе G-100».

Определение ферментативной активности нативного ХТ проводили в 0,1 н. KCl на рН-стабе «Radiometer RTS-882» (Дания) по скорости гидролиза субстрата (АТЭЭ) при рН 8,0 [10]. При определении активности ХТ в конъюгате учитывали смещение рН-оптимума фермента. Концентрация АТЭЭ в кювете рН-стаба составляла 10 ммолей.

Таблица 1

Некоторые характеристики синтезированных образцов ПЛ – ДТПА – С

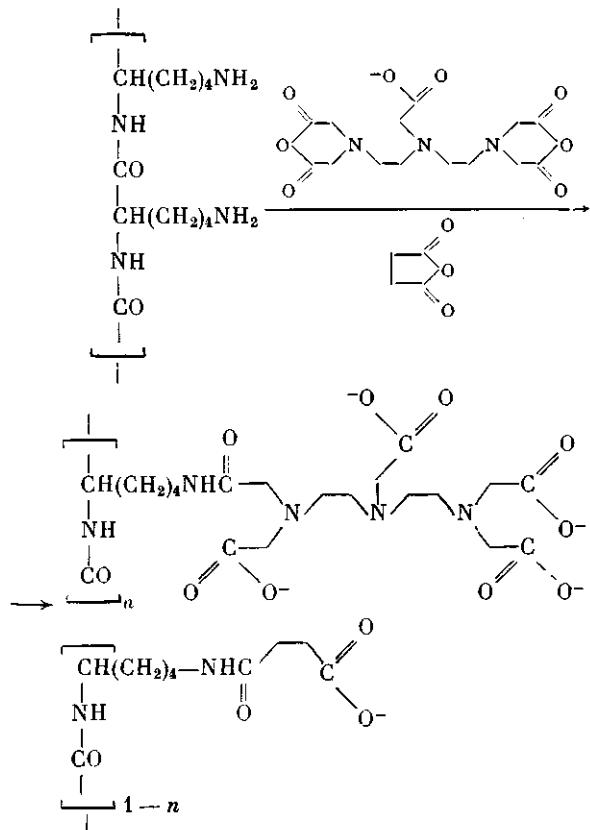
Полимер	Степень модификации n		$M \cdot 10^{-4}$
	по анализу ТИБС	по связыванию Fe^{3+}	
ПЛ – ДТПА ₂₄ – С	0,24	0,16	~5,0
ПЛ – ДТПА ₅₃ – С	0,53	Не определяли	~5,0
ПЛ – ДТПА ₇₅ – С	0,75	0,31	~5,0
ПЛ – ДТПА ₉₂ – С	0,92	Не определяли	~5,0
ПЛ – ДТПА ₃₆ – С	0,36	То же	~2,5

Таблица 2

Влияние концентрации циклического ангидрида ДТПА в растворе в процессе модификации ПЛ на молекулярную массу ПЛ – ДТПА – С

Полимер	$[\text{ПЛ}]_0$	$[\text{Ангидрид ДТПА}]_{\text{макс}}$	$M \cdot 10^{-4}$	
			ПЛ	ПЛ – ДТПА – С
		мг/мл		
ПЛ – ДТПА ₂₄ – С	2,5	1,0	1,4	~5,0
ПЛ – ДТПА ₅₃ – С	2,5	2,0	1,4	~5,0
ПЛ – ДТПА ₃₆ – С	2,5	0,1	1,8	~2,5

На основе ПЛ с $M=14 \cdot 10^3$ и $18 \cdot 10^3$ были получены пять образцов ПЛ – ДТПА – С различных степеней модификации и ММ по схеме



Данные анализа с ТНБС и прямого определения числа ДТПА-остатков по связыванию Fe^{3+} различались (табл. 1). Вероятно, это вызвано недоступностью для ТНБС тех первичных аминогрупп ПЛ, которые участвуют в образовании внутренней соли с остатками ДТПА.

На степень спивки и на ММ полученных полимеров сильно влияет концентрация ангидрида ДТПА в растворе (табл. 2); ее можно снижать, добавляя модификатор к раствору ПЛ несколькими порциями. Это важно главным образом потому, что высокомолекулярные полимеры, как правило, не вводят в организм.

На рис. 1 показано изменение эффективности связывания первичных аминогрупп МЭТ с различными образцами ПЛ – ДТПА – С, активированными только ЭДК, в зависимости от времени инкубации ПЛ – ДТПА – С с ЭДК на первой стадии. На этом же рисунке аналогичная зависимость показана для полностью сукцинированного ПЛ (ПЛ – С). Видно, что введение в цепи ПЛ остатков ДТПА существенно ухудшает способность полимера связываться с аминогруппами.

Этот результат интересно сопоставить с данными по скорости утилизации ЭДК в процессе активации ПЛ – ДТПА – С и ПЛ – С, приведенными на рис. 2. (В данном случае, как и на рис. 1, количество полимера нормируют по весу, поэтому измеряют не константы скорости, которые зависят от мольной концентрации групп COOH , а лишь интегральные скорости образования активированного полимерного производного – О-ацилизомочевины [9].) Видно, что эти скорости уменьшаются с ростом степени модификации полимера остатками ДТПА; в то же время видно, что скорость активации ПЛ – С даже меньше ПЛ – ДТПА₅₃ – С; т. е. быстрым образованием О-ацилизомочевины в случае ПЛ – С нельзя объяснить данные рис. 1.

Можно предположить, что образовавшаяся в случае ПЛ – ДТПА – С О-ацилизомочевина принимает более активное, чем в случае ПЛ – С, учас-

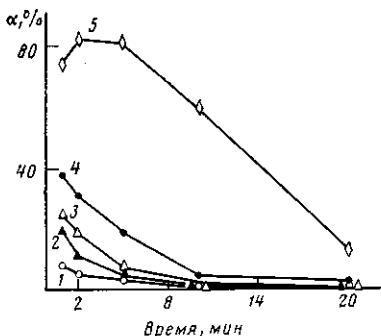


Рис. 1

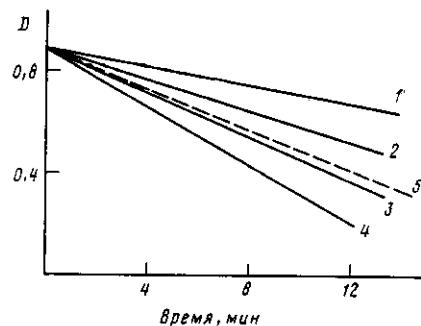


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость эффективности связывания аминогрупп МЭТ α от времени активации полимера в присутствии только ЭДК. [ПЛ-ДТПА-С] = 1,5 мг/мл. Здесь и на рис. 2 степень модификации полимеров ПЛ-ДТПА-С остатками ДТПА составляет 92 (1), 75 (2), 53 (3) и 24% (4). [ЭДК] = 1,0 мг/мл

Рис. 2. Кинетика падения оптической плотности раствора при 247 нм после добавления ЭДК к водному раствору ПЛ-ДТПА-С (1-4) и ПЛ-С (5). [Полимер] = 0,25 мг/мл

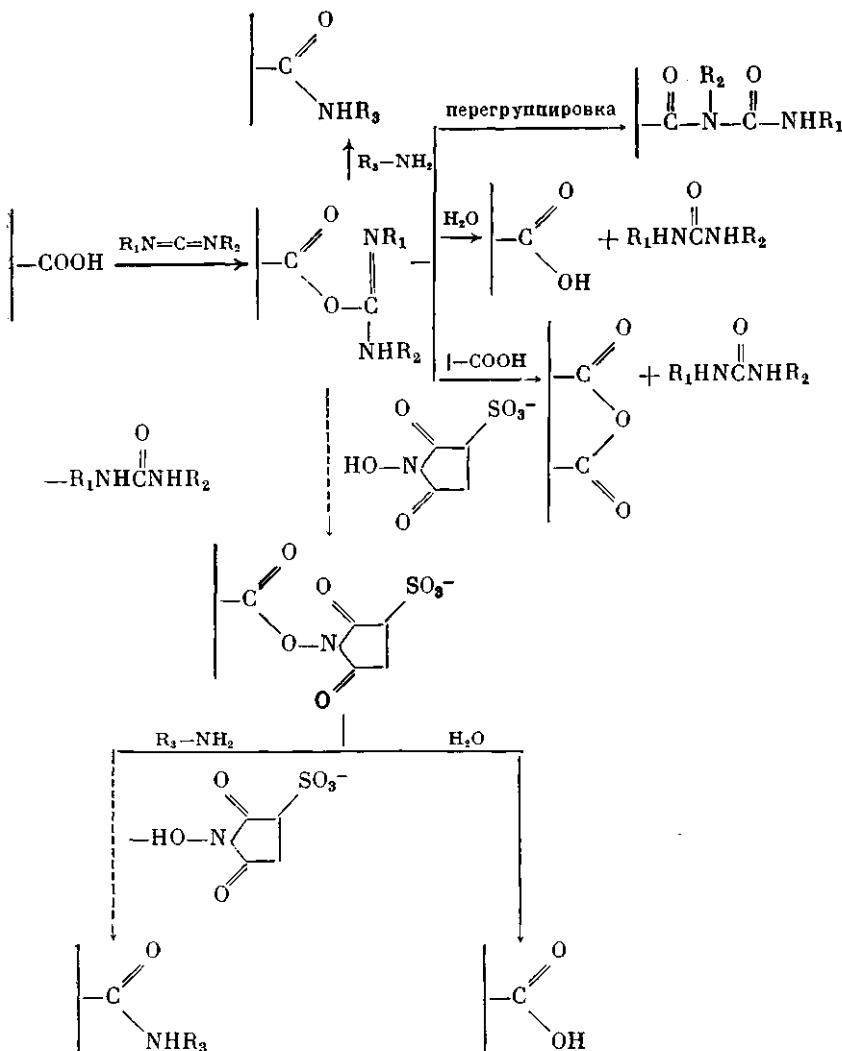
тие в побочных реакциях, которые могут протекать как на стадии активации, так и на второй стадии, приводя к уменьшению роли взаимодействия с аминогруппами. По крайней мере, в пользу первого предположения свидетельствует смещение оптимального времени активации (соответствующего максимальной концентрации О-ацилизомочевины и, следовательно, максимальной эффективности связывания аминогрупп) до 5–10 мин в случае ПЛ – С по сравнению с 1 мин в случае ПЛ – ДТПА – С, но наиболее вероятно, что имеют место оба процесса.

Известно, что время жизни активированного по карбоксильным группам производного можно повысить за счет использования ГССИ и образования гидрофильных N-оксисульфосукцинимидных эфиров, эффективно взаимодействующих с аминогруппами и более устойчивых к гидролизу, чем О-ацилизомочевина [11]. Так, на примере модификации гемоцианина глицином Старос с сотр. [11] показали, что эффективность связывания глицина в присутствии ГССИ повышается в 15 раз.

Однако в предложенной в работе [11] методике в реакционной смеси одновременно присутствовали карбодиимид, ГССИ, белок и карбоксилсодержащий модификатор. Использование такого подхода в нашей системе могло бы привести к образованию значительных количеств побочных продуктов, например сшитых молекул белка. Поэтому в отличие от работы [11] мы проводили процесс карбодиимидной модификации в две стадии [9], причем на первой стадии активации COOH-содержащего полимера карбодиимидом добавляли ГССИ.

Было установлено увеличение выхода продукта при добавлении ГССИ в случае связывания модельного низкомолекулярного амина МЭТ с ПЛ – ДТПА – С. На рис. 3 представлены две кривые, иллюстрирующие зависимость эффективности связывания аминогрупп МЭТ с ПЛ – ДТПА₃₆ – С, активированным либо в присутствии только ЭДК, либо в присутствии смеси ЭДК и ГССИ. Видно, что эти кривые соотносятся друг с другом примерно так же, как и кривые для ПЛ – С и ПЛ – ДТПА – С, представленные на рис. 1. Максимальная эффективность связывания аминогрупп МЭТ полимером, активированным в присутствии ГССИ, достигает 90%, что в ~3 раза превышает соответствующее значение для полимера, активированного только ЭДК. Кроме того, временной оптимум активации ПЛ – ДТПА – С смещается в область 5–10 мин.

Представленные закономерности иллюстрирует приведенная ниже схема возможных превращений в описанной системе.



Вероятно, что в присутствии ГССИ уменьшается роль побочных реакций О-ацилизомочевины за счет преимущественного протекания реакций, выделенных на схеме штриховыми стрелками [11, 12].

Закономерности, полученные для низкомолекулярного амина — МЭТ, были подтверждены и при получении конъюгатов ПЛ — ДТПА — С с белками. Так, в случае ХТ было установлено, что связывание белка с ПЛ — ДТПА — С при исходном мольном отношении 1 : 1 и при активации ПЛ — ДТПА — С только ЭДК в течение 1 мин ухудшается с ростом степени модификации полимера остатками ДТПА. Об этом свидетельствуют данные, полученные с помощью ГПХ соответствующих конъюгатов на «Сефадексе G-100». Из рис. 4 видно, что в конъюгат 1 : 1 с ПЛ — ДТПА₅₃ — С включается ~95% ХТ. В то же время в конъюгаты с ПЛ — ДТПА₂₄ — С и ПЛ —

Таблица 3

Влияние степени модификации полимера остатками ДТПА на эффективность связывания α и процент сохранения ферментативной активности ХТ в конъюгате β

Полимер	α , %	β , %
ПЛ — ДТПА ₂₄ — С	100	80
ПЛ — ДТПА ₅₃ — С	95	66
ПЛ — ДТПА ₇₅ — С	70	65

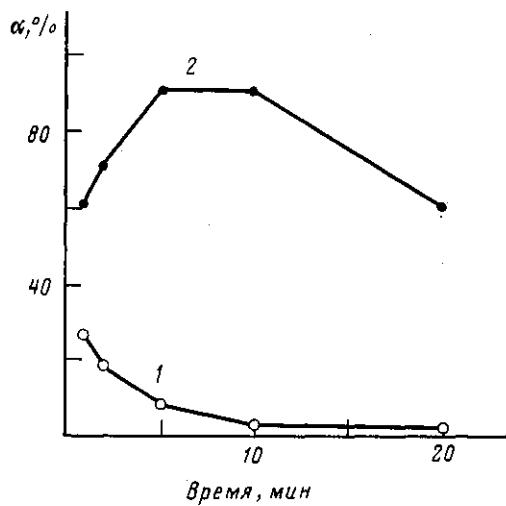


Рис. 3. Зависимость эффективности связывания аминогрупп МЭТ полимером ПЛ-ДТПА₃₆-С, активированным ЭДК (1), или смесью ЭДК и ГССИ (2), от времени активации полимера. [Полимер]=1,5; [ЭДК]=1,5; [ГССИ]=2,4 мг/мл

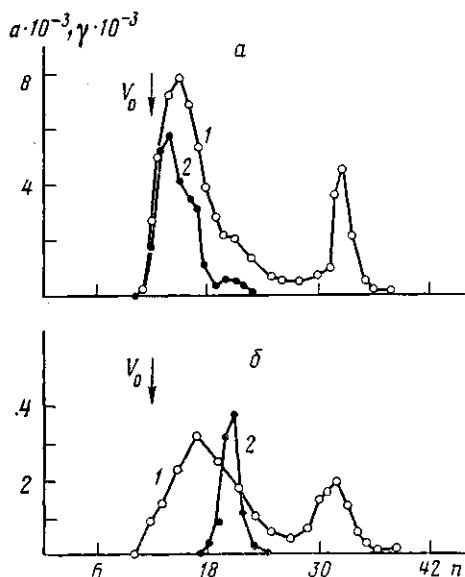


Рис. 4

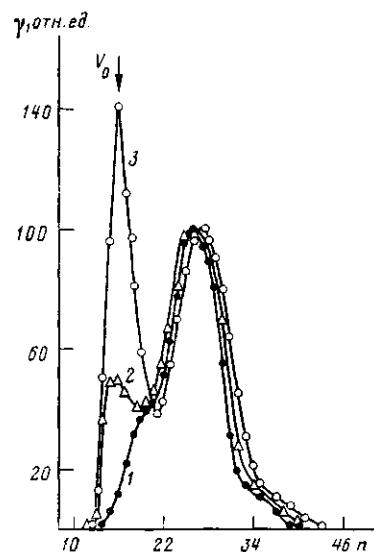


Рис. 5

Рис. 4. ГПХ на «Сефадексе G-100» (1,6×30 см) ⁵⁹Fe-меченого конъюгата ХТ-ПЛ-ДТПА₅₃-С (а) и свободных ХТ и ⁵⁹F-меченого полимера (б). 1 – радиоактивность γ , расп/мин; 2 – относительная ферментативная активность $a_{\text{отн.}}$. $V_{\text{фр}}=2,5$ мл, V_0 – свободный объем колонки. Здесь и на рис. 5 элюент 0,05 моль/л ацетат+ +0,15 моль/л NaCl, pH 6,5

Рис. 5. ГПХ на «Сефадексе G-100» (1,6×30 см) свободного ¹¹¹In-меченого ПЛ-ДТПА₃₆-С (1), конъюгатов ПЛ-ДТПА₃₆-С с моноклональными антителами против АПФ, полученных при активации полимера только ЭДК (2) или смесью ЭДК и ГССИ (3). $V_{\text{фр}}=2$ мл

ДТПА₇₅-С включается ~100 и 70% ХТ соответственно. Кроме того, как видно из табл. 3, с увеличением степени модификации полимера остатками ДТПА (а следовательно, и с увеличением плотности отрицательного заряда полимерной цепи) падает процент сохранения ферментативной активности ХТ в конъюгате.

При переходе от модельного белка (ХТ) к иммуноглобулину G (антителам против АПФ, $M=1,5 \cdot 10^5$) обнаружили, что выход связывания при конъюгировании его с хелатным полимером (ПЛ – ДТПА₃₆ – С, $M=2,5 \cdot 10^4$) резко уменьшается. (В данном случае с помощью ГПХ на «Сефадексе G-100» мы следили лишь за процентом включения в конъюгат полимера, так как изменение ММ IgG было весьма незначительным. Процент модифицированных IgG поэтому определяли косвенно.) Так, при исходном мольном отношении (ПЛ – ДТПА₃₆ – С) : IgG = 2 : 1 и активации ПЛ – ДТПА₃₆ – С лишь в присутствии ЭДК процент связывания полимера составляет 8 %, что соответствует в среднем модификации 16 % молекул IgG. Наиболее вероятной причиной такого отличия выхода связывания IgG от соответствующего значения для ХТ является, по нашему мнению, различие в значениях изоэлектрических точек этих белков: молекула ХТ при pH 8,5 на второй стадии реакции заряжена положительно, в то время как молекула IgG – отрицательно. Соответственно взаимодействие с отрицательно заряженным полимером облегчается в случае ХТ и затрудняется в случае IgG.

Существенного увеличения выхода связывания IgG можно добиться, если на стадии активации ПЛ – ДТПА₃₆ – С использовать ГССИ. При этом процент включения в конъюгат полимера повышается до 25 %, т. е. возрастает более чем в 3 раза. Соответственно до 50 % увеличивается средняя степень модификации молекул IgG. Описанный эффект хорошо иллюстрирует рис. 5, на котором представлены хроматограммы ¹¹¹In-меченых конъюгатов и свободного полимера на «Сефадексе G-100».

Таким образом, предлагаемый нами метод получения конъюгатов хелатных полимеров с белками с использованием ГССИ может оказаться весьма полезным для дальнейшего развития неинвазивных методов диагностики и терапии на основе моноклональных антител. Незначительное падение ферментативной активности ХТ при конъюгировании его с ПЛ – ДТПА – С даже высокой степени модификации позволяет предположить, что и при конъюгировании специфических антител потеря их иммунологической активности за счет отрицательного заряда полимера также может быть не слишком высокой. Однако максимальная эффективность связывания антител класса IgG с хелатными полимерами составляет ~50 %, и в настоящее время стоит задача дальнейшего повышения выхода связывания антител с полимерами без их инактивации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Торчилин В. П., Ко Б. А., Клибанов А. Л., Слинкин М. А., Хабер Э., Смирнов В. Н. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1986. Т. 102. № 7. С. 63.
2. Shreve P., Aisen A. M. // Magn. Res. Med. 1986. V. 3. № 2. P. 336.
3. Torchilin V. P., Klibanov A. L., Nossiff N. D., Slinkin M. A., Strauss H. W., Haber E., Smirnov V. N. // Hybridoma. 1987. V. 6. № 3. P. 229.
4. Kozak R. W., Atcher R. W., Gansow O. A., Friedman A. M., Hines J. J., Waldman T. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 2. P. 474.
5. Anderson-Berg W. T., Strand M., Lempert T. E., Rosenbaum A. E., Joseph P. M. // J. Nucl. Med. 1986. V. 27. № 6. P. 829.
6. Manabe Y., Longley C., Furmanski P. // Biochimica et Biophysica Acta. 1986. V. 883. № 3. P. 460.
7. Hnatowich D. J., Hayne W. W., Childs R. L. // Intern. J. Appl. Radiat. Isot. 1982. V. 33. № 5. P. 327.
8. Spadaro A. C. C., Dragsetta W., Del Lama S. N., Camargo A. C. M. // Anal. Biochem. 1979. V. 96. № 2. P. 317.
9. Papisov M. I., Maksimenko A. V., Torchilin V. P. // Enzyme Microb. Technol. 1985. V. 7. № 1. P. 11.
10. Torchilin V. P., Goldmacher V. S., Smirnov V. N. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1978. V. 85. № 3. P. 983.
11. Staros J. V., Wright R. W., Swinge D. M. // Anal. Biochem. 1986. V. 156. № 1. P. 220.
12. Рич Д., Синег Ж. // Пептиды. Т. 1. / Под ред. Гросса Э., Майенхоффера И. М., 1983. 421 с.

Институт экспериментальной кардиологии
Всесоюзного кардиологического научного
центра АМН СССР

Поступила в редакцию
14.XII.1987

**PREPARATION OF CONJUGATES OF PROTEINS WITH CHELATE
POLYMERS USING WATER-SOLUBLE CARBODIIMIDE
AND N-HYDROXYSULFOSUCCINIMIDE**

Klibanov A. L., Slinkin M. A., Luk'yanov A. N., Torchilin V. P.

S u m m a r y

Water-soluble chelate polymers on the basis of polylysine and diethylenetriamine-pentaacetic acid have been synthesized. Influence of the degree of modification of polylysine with acid residues on activation of chelate polymers with 1-ethyl-3(3'-dimethylaminopropyl) carbodiimide was studied. An approach to preparation of conjugates of chelate polymers with proteins based on their activation with the mixture of carbodiimide and N-hydroxysulfosuccinimide was developed. The optimal conditions of activation were found.