

УДК 541(49 + 64)

ИММУНОКОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ ПОЛИМЕРОВ: НОВЫЕ АГЕНТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ (Обзор)

© 1994 г. В. П. Торчилин

Центр визуализации и фармацевтических исследований, Массачусетская центральная больница
и Гарвардская Медицинская Школа
Чарльстон, Массачусетс 02129, США

Поступила в редакцию 25.10.93 г.

Синтезирован новый класс полимеров для получения меченых многозарядными ионами тяжелых металлов белков (антител) для использования в гамма и магнитной резонансной визуализации. В большинстве экспериментов использовали полилизин различных молекулярных масс, модифицированный многочисленными комплексообразующими агентами, такими как диэтилентриаминпентауксусная кислота. Модификация позволяет ввести в одну молекулу полимера ($M_w = 5.5 \times 10^4$) до 100 комплексообразующих звеньев, способных к прочному связыванию металлов, таких как In, Gd, Mn, Tc, Re и других, широко используемых в радиографии и ЯМР-томографии. Чтобы сделать полимерные хелаты специфичными к мишениям, полимеры были конъюгированы с моноклональными антителами. Разработана специальная методика модификации антител комплексообразующими полимерами, позволяющая связывать с полимером целое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент минимальным числом ковалентных связей и с минимальной потерей иммунной активности. Исследования *in vitro* с радиоактивными металлами показали чрезвычайно высокую активность антител как меток: в случае ^{111}In удельная радиоактивность достигала 100 мКи/мг белка по сравнению с 3 - 5 мКи/мг, получаемыми традиционными способами мечения. Исследования *in vivo* на кроликах с искусственноенным инфарктом миокарда и на мышах с имплантированной грудной опухолью человека показали быстрое и количественное попадание метки в мишень. Синтезированы амфи菲尔ные производные хелатирующих полимеров, способные включаться в фосфолипидные мембранны. Липосомы с поверхностно включенными Gd-содержащими хелатирующими полимерами были с успехом использованы для МР-визуализации лимфатических узлов кроликов.

Иммунорадиография и ЯМР-томография с использованием антител в настоящее время широко применяются для диагностических целей под общим названием "иммуноотображение" и составляют значительную часть современной ядерной медицины [1]. Общий подход основан на парентеральном введении специфически меченых моноклональных антител к определенным антигенам интересующей области с последующей регистрацией (визуализацией) соответствующей метки, аккумулированной ими в процессе взаимодействия антиген-антитело. Более того, подобный подход широко используется в терапевтических целях [2]. Большинство изотопов и МР-активных веществ для мечения антител являются переходными металлами. Поскольку металлы не способны напрямую взаимодействовать с белком (за исключением некоторых особых случаев), антитело должно быть каким-либо образом модифицировано для придания ему способности взаимодействовать и связываться с металлами. Наиболее ясное решение этой проблемы заключается во введении хелатирующих участков в белковую молекулу.

Приготовление антител, меченых металлом для *in vivo* иммуновизуализации должно отвечать некоторым необходимым критериям: модификация антитела хелатирующей группой и последующее связывание металла не должно влиять на специфические свойства антитела и сродство к антигену-мишени; хелатирующая группа должна обеспечивать прочное связывание металла с белком *in vivo*; необходимо достичь высокой удельной "загрузки" металлом, чтобы уменьшить общее количество принимаемого антитела; накопление меченого антитела в мишени должно быть быстрым и количественным, как и удаление свободного меченого антитела из крови, чтобы уменьшить фоновый сигнал и увеличить соотношение антитела в мишени к антителу вне мишени.

Очевидно, что для увеличения эффективности мечения каждая отдельная молекула антитела должна быть модифицирована многочисленными хелатными остатками. Однако избыточная модификация антитела может заметно повлиять на его сродство к мишени и способность связываться с ней [3] (рис. 1). Чтобы ввести большое количество указанных групп в единичную молекулу антитела, было предложено использовать полимер-

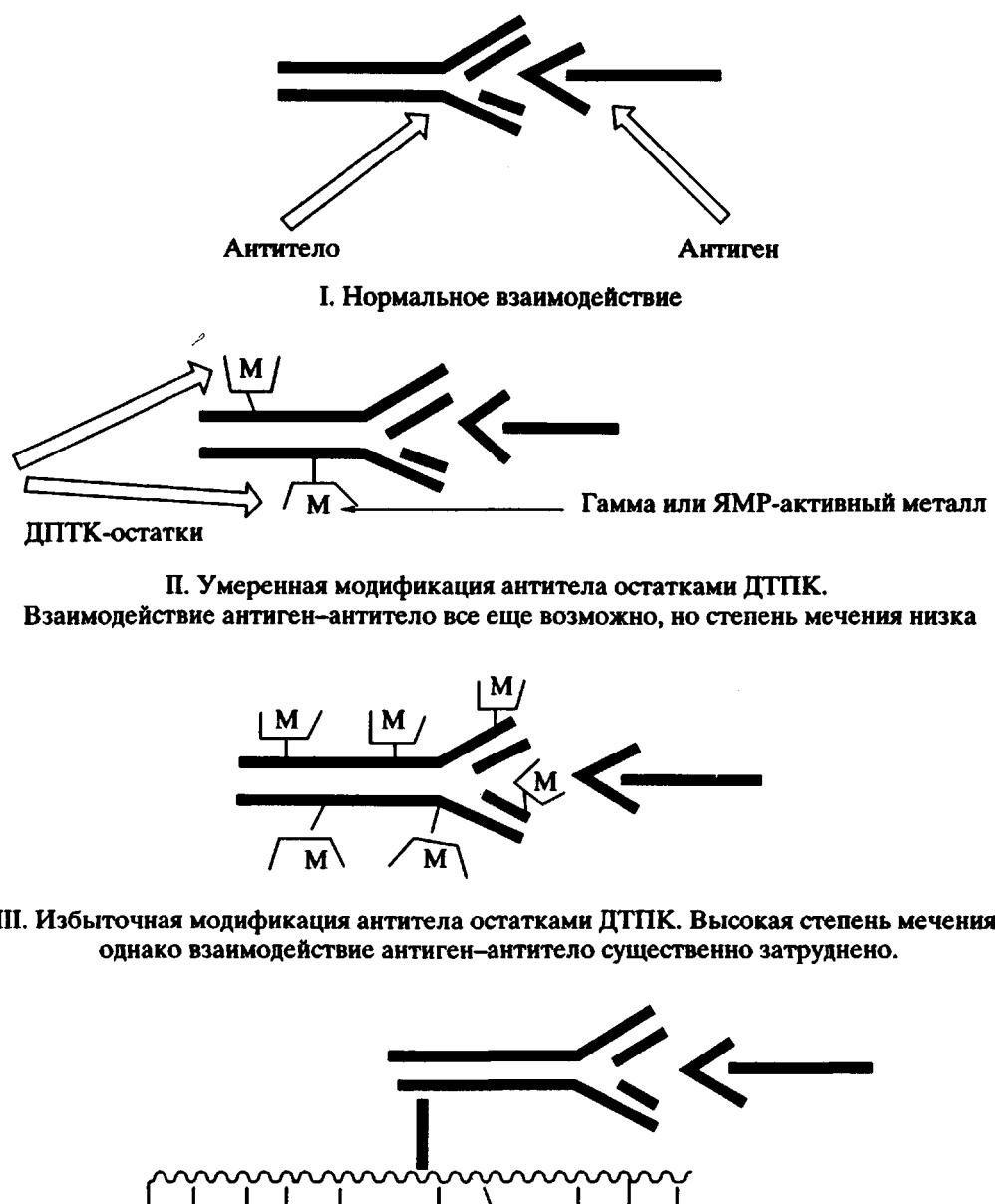


Рис. 1. Возможные пути модификации антитела комплексообразующей группой (ДТПК) [14].

ную цепь, несущую присоединенные участки комплексообразователя [4 - 8]. Применение таких хелатирующих полимеров обеспечивает существенное увеличение количества центров связывания тяжелых металлов (и ионов металлов) на молекулу антитела без его нежелательной инактивации или по крайней мере с минимальным влиянием на специфические свойства антитела. Более того, присутствие полимерной цепи в конъюгате хелатор–антитело открывает дополнительные возможности для химической модификации, которая может изменить биораспреде-

ление конъюгата и скорость его выведения в требуемой области.

КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИЕ ПОЛИМЕРЫ И ИХ СВЯЗЫВАНИЕ С МОНОКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

Все имеющиеся хелатирующие полимеры могут быть условно разделены на две большие группы.

1. Полимеры, которые могут связывать металл с цепью непосредственно или после модифи-

кации некоторыми нехелатирующими соединениями.

2. Полимеры, содержащие остатки предварительно синтезированного хелата, присоединенного к полимерной цепи.

К сожалению, даже для тех полимеров, которые обладают определенным средством к ионам тяжелых металлов (таких как, например, разветвленный полиэтиленимин), это средство недостаточно высоко, чтобы иметь реальный практический интерес [9]. Природные хелаты с высоким средством, такие как сывороточный трансферрин, имеют незначительное количество связывающих центров и высокий молекулярный вес, что делает его практическое использование совершенно невозможным. Поскольку для практических целей существенным элементом является крайне высокая термодинамическая и кинетическая стабильность хелатных комплексов металлов [10], очень привлекательными оказываются предварительно синтезированные комплексообразователи, такие как производные полиамино-поликарбоновой кислоты, включая один из наиболее часто используемых комплексообразова-

телей – диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТПК). Эти хелаты обеспечивают сильное аффинное связывание широкого ряда ионов тяжелых металлов, например Fe, In, Tc, Re, Ga, Gd, Mn, Eu, I, Bi, At, Sm и т.д. и часто используются для непосредственной модификации белков (антител).

Для присоединения многочисленных хелатирующих участков полимерная цепь должна содержать значительное количество реакционноспособных групп, таких как амино-, карбокси-, альдегидные или SH-группы. Для этой цели могут быть использованы как природные, так и синтетические полимеры, причем наиболее часто используют поли-L-лизин (ПЛЛ), содержащий свободную аминогруппу в каждом звене, и окисленный декстрин, содержащий большое число альдегидных групп. Для связывания хелатора с полимером обычно используют активный интермедиат, содержащий смешанный ангидрид, циклический ангидрид, N-гидрокисукцинимидный эфир, тетрафторфениловый эфир, изотиоцианат и т.д. Схема взаимодействия циклического ангидрида ДТПК с аминосодержащим полимером представлена ниже.

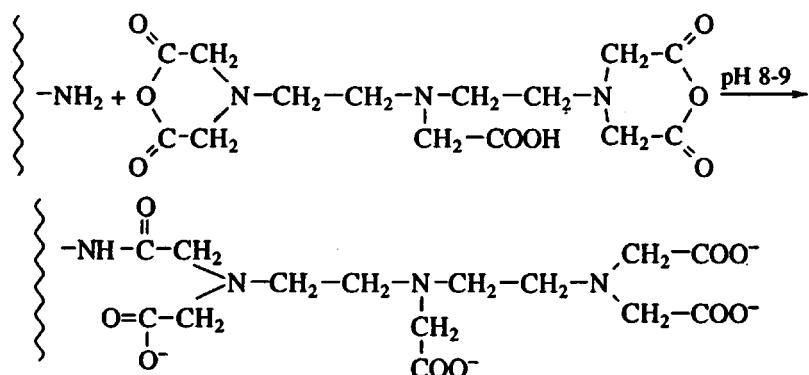


Схема 1

Для избежания возможного сшивания аминосодержащего полимера бифункциональными производными, такими как циклический ангид-

рид ДТПК, успешно используется смешанный ангидрид ДТПК, например, для получения производных полилизина и полиэтиленимина [11].

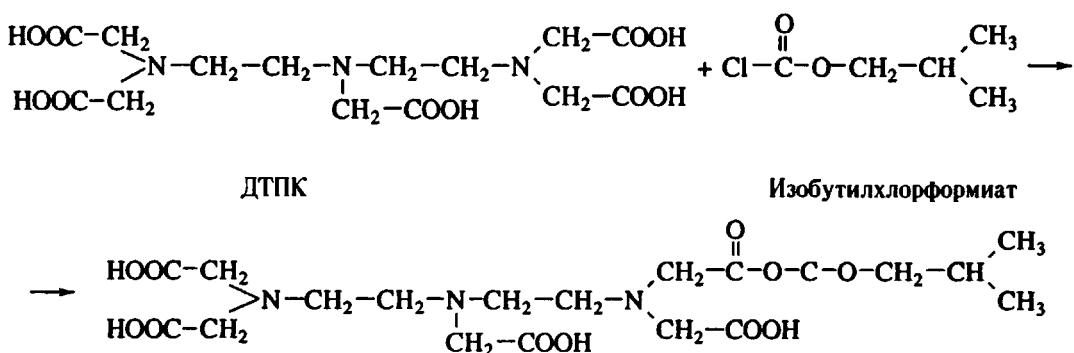
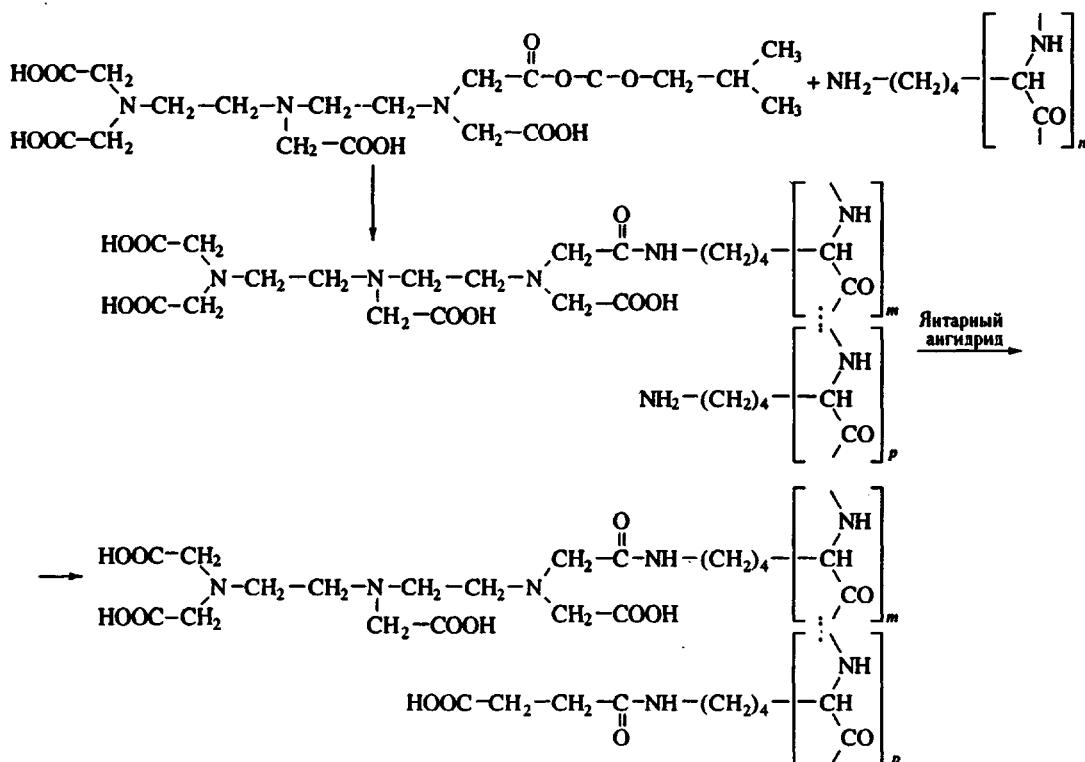


Схема 2



Продолжение схемы 2

Из-за стерических препятствий модификация аминогрупп полимеров объемистыми группами хелатора никогда не проходит полностью и остаточные свободные аминогруппы могут быть легко блокированы сукциновым ангидридом. Реакция, приведенная выше, важна для придания полимеру общего отрицательного заряда, который

in vivo позволит уменьшить неспецифический захват содержащих метку конъюгатов клетками вне мишени, несущими слабоотрицательный поверхностный заряд [11]. Другим примером получения хелатирующего полимера является связывание дефероксамина с полимером, содержащим, например, активированные карбоксильные группы:

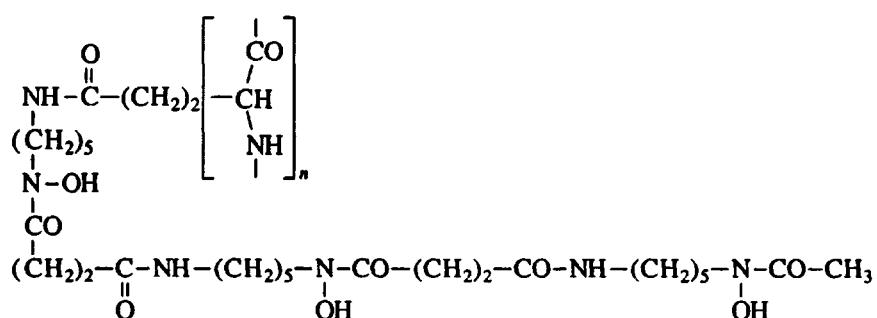
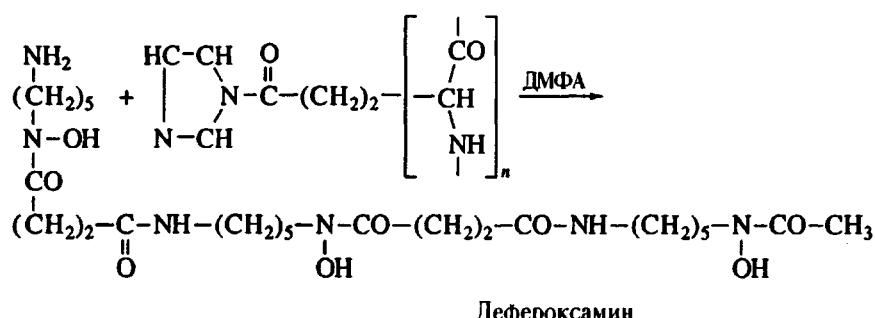


Схема 3

Химия синтеза комплексообразующих полимеров описана в работе [12].

Следующим шагом в получении комплексирующих агентов является связывание хелатирующих полимеров с антителами или их фрагментами. Для связывания хелатирующих полимеров с белковой глобулой обычно используют

классические приемы иммобилизации. Наиболее часто применяют химические методы связывания, хотя возможно и применение специфического аффинного связывания, такого как у пары avidin-биотин (см. обзор [12]). До взаимодействия с антителом хелатирующий полимер активируют некоторыми из доступных методов, такими как обработка карбодиимидом или тиолирование

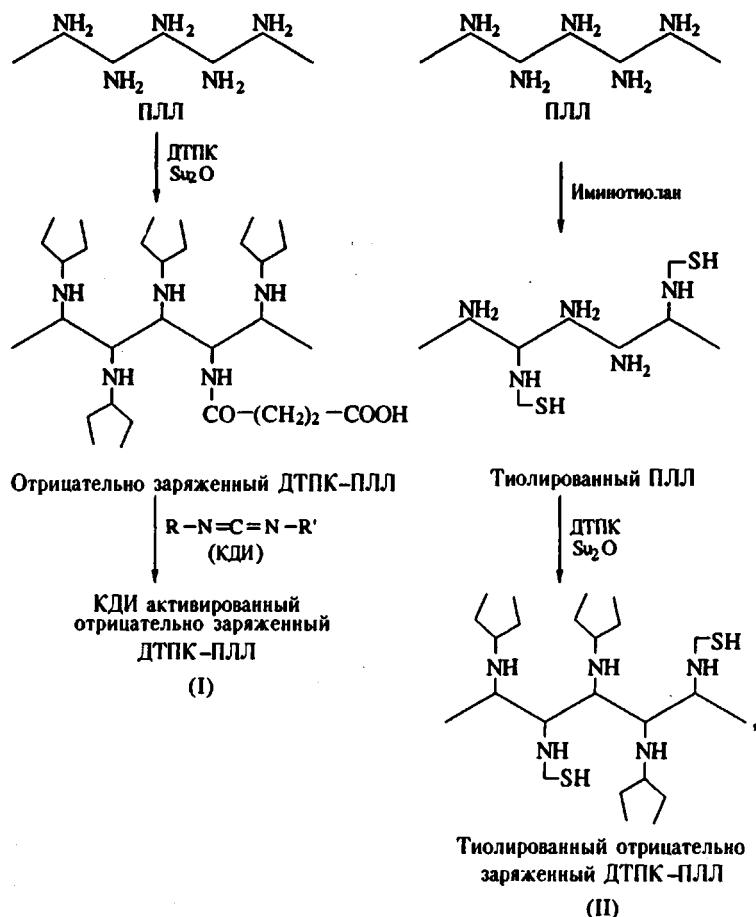


Схема 4

затем связывают с белком (например, с "нормальным" или тиолированным фрагментом антигенсвя-

зывающего участка белка (ACU)), образуя иммобилизованный участок белка (ACU), образующим амидную или тиоэфирную связь соответственно

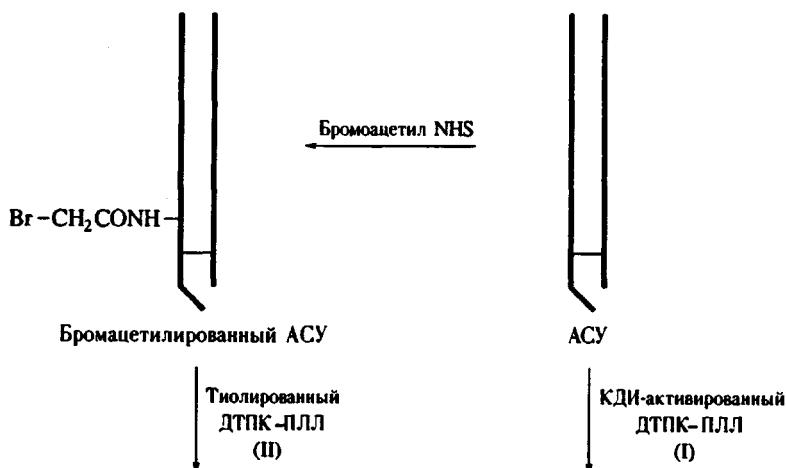
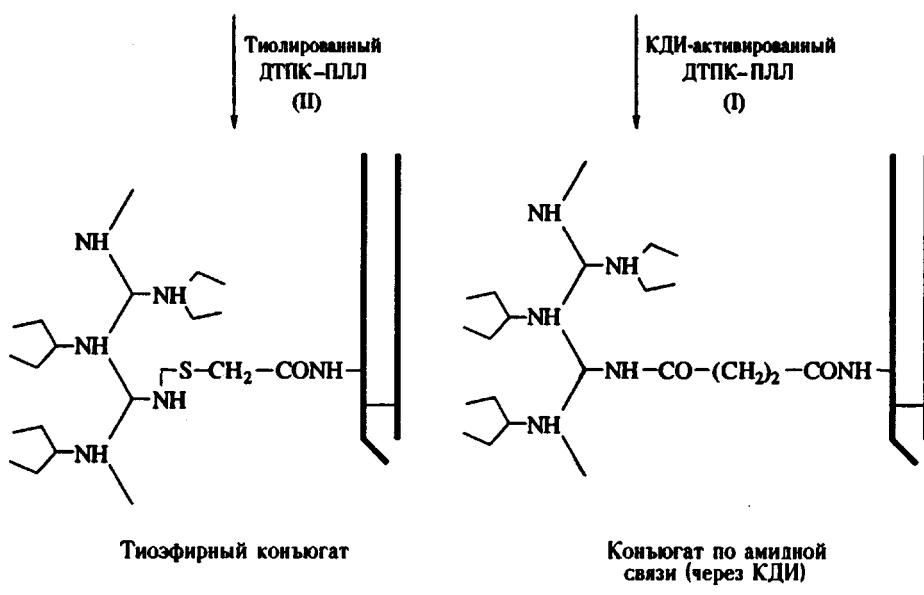


Схема 5

ТОРЧИЛИН



Продолжение схемы 5

С успехом могут быть использованы и бифункциональные реагенты, такие как N-сукцинимидил-(2'-пиридилдитио)пропионат (СПДП);

в этом особом случае в хелатирующий полимер должны быть введены свободные группы SH.

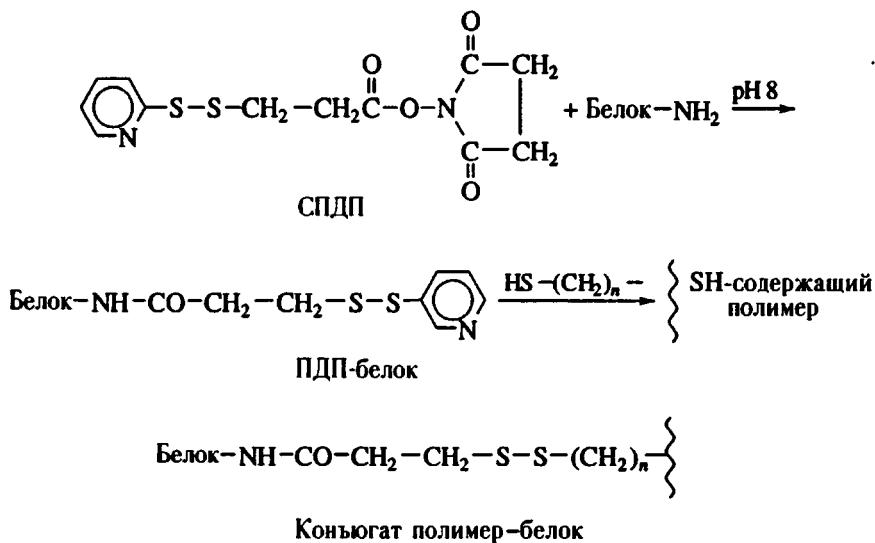


Схема 6

Комплексообразующие полимеры, содержащие группы SH, легко взаимодействуют с антителами, предварительно модифицированными соединениями, содержащими малеимид, такими как сукцинимидилмалеидометилциклогексанкарбоксилат (СКМЦ) (см. схему 7).

Вторая возможность может быть реализована в том случае, если углеводный участок антитела окислен периодатом и образовавшиеся альдегидные группы взаимодействуют с карбоксилосодержащим комплексообразующим полимером, модифицированным гидразином (см. схему 8).

К сожалению, все химические методы, описанные здесь и изначально применяющиеся для синтеза хелатирующих полимеров и их связывания с белками, часто давали сшитые продукты с низкой аффинностью антитела вследствие того, что активированные полимеры содержали многочисленные активные группы, разнесенные по полимерной цепи далеко друг от друга и способные, таким образом, действовать как сшивающие агенты. Пытаясь преодолеть это, мы предложили и экспериментально разработали новую схему конъюгации хелатора с антителом, включающую

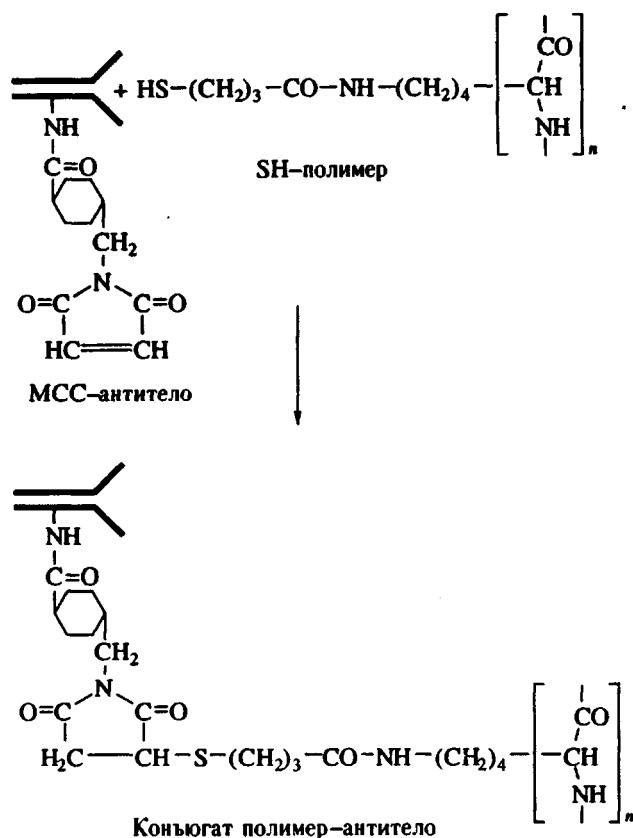


Схема 7

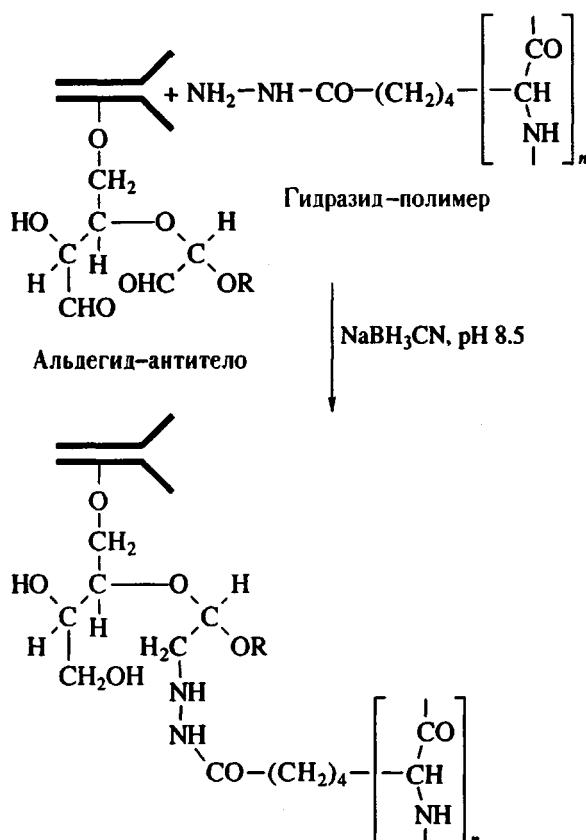


Схема 8

щую получение хелатирующего полимера, содержащего одну концевую активную группу, способную взаимодействовать с активированным антителом [13, 14]. Этот подход основан на использовании КБЗ-защищенного ПЛЛ с одной свободной концевой аминогруппой, которая переводится в активную форму, с последующим снятием защиты и присоединением остатков ДТПК. Этот процесс может включать также применение различных активирующих би-

функциональных агентов, таких как СПДП и СМСК.

Ниже представлены химические превращения в типичном процессе получения конъюгата, включающем предварительный синтез одноточечно модифицированного ПЛЛ-ДТПК, активацию антитела посредством СПДП и последующее конъюгирование активированного антитела с активированной концевой группой хелатирующего полимера.

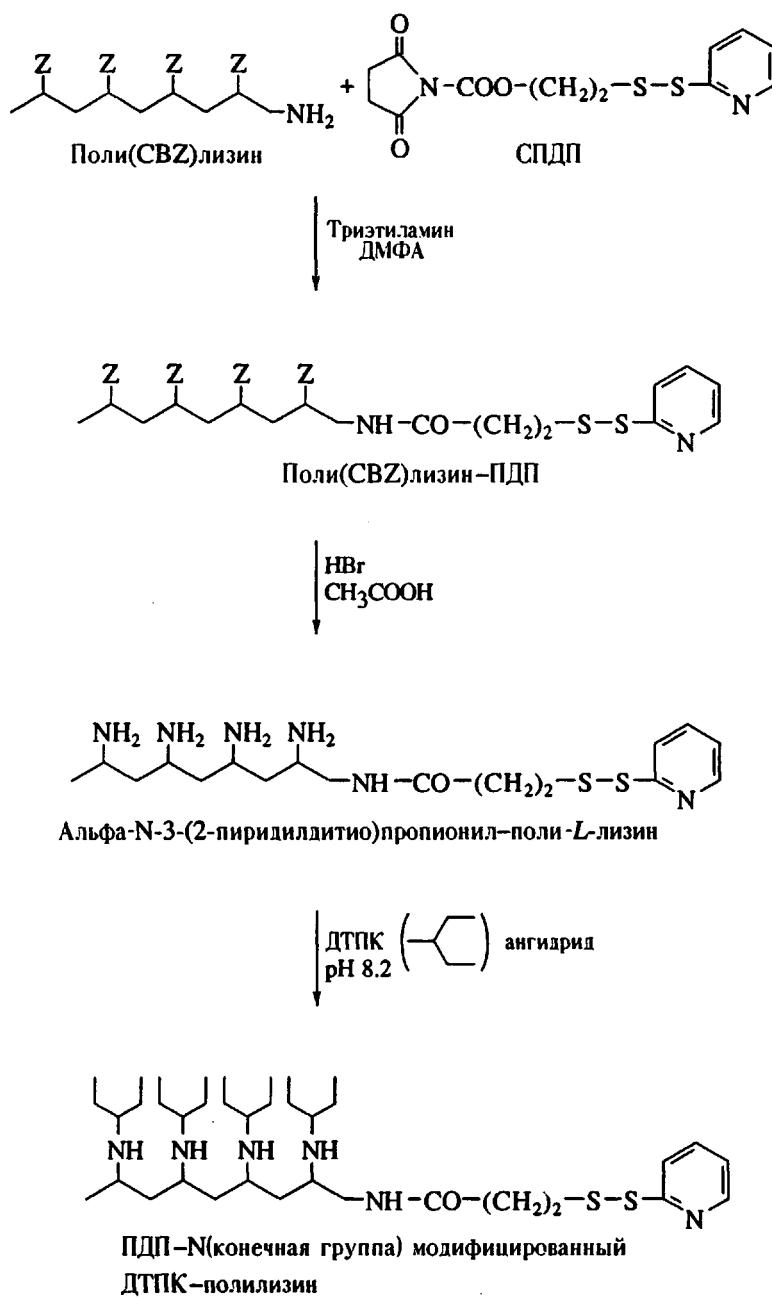


Схема 9

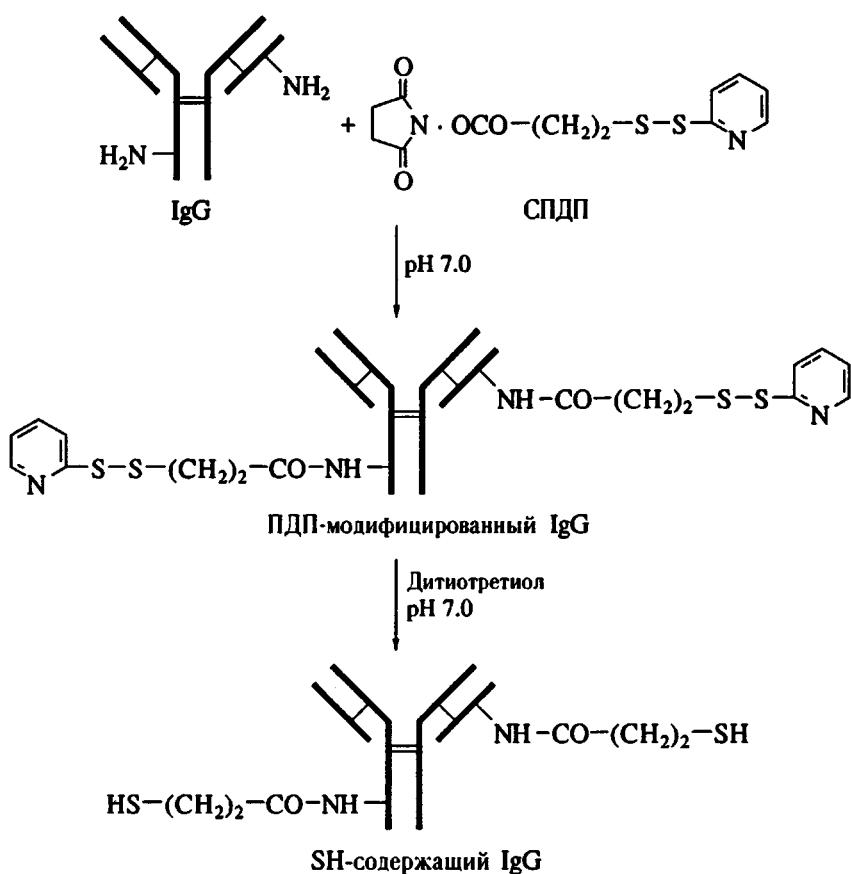


Схема 10

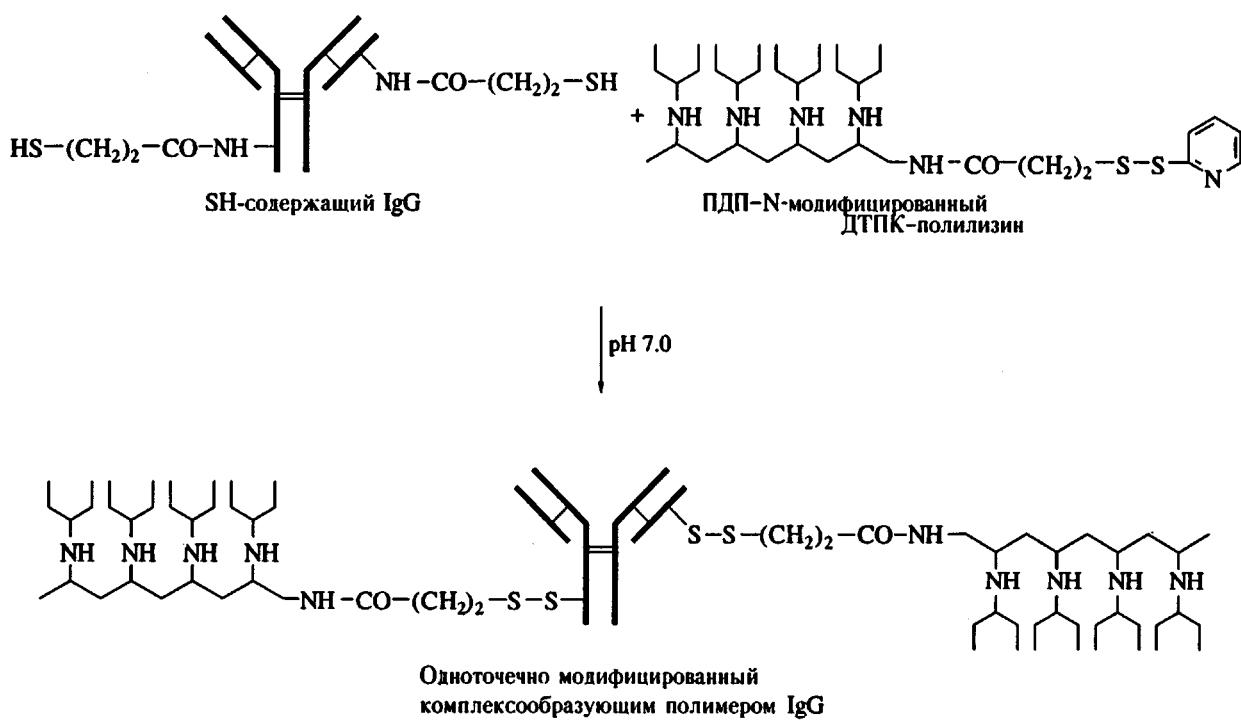


Схема 11

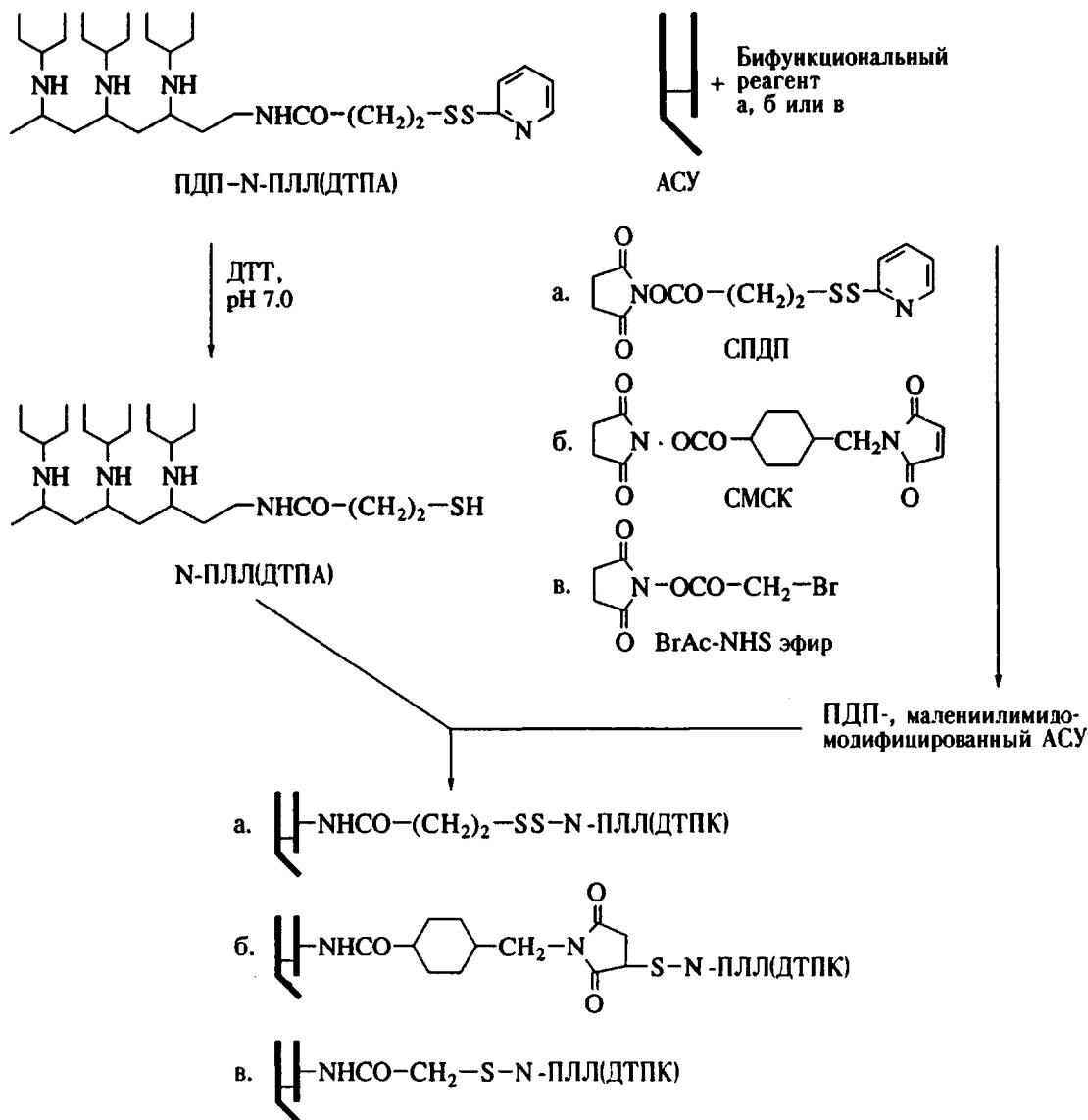


Схема 12

Более обобщенная схема, разработанная нами и описывающая несколько возможных путей одноточечного присоединения хелатирующего полимера к антигенсвязывающему участку антитела с помощью таких реагентов как СПДП, СМСК или посредством бромацетилирования, представлена на схеме 12 [15].

СВОЙСТВА АНТИТЕЛ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИМИ ПОЛИМЕРАМИ

Усовершенствованные способы синтеза и активации хелатирующих полимеров и их связывания с моноклональными антителами позволили резко увеличить удельную емкость антител по

радиоизотопам тяжелых металлов. Данные, представленные на рис. 2, ясно показывают это увеличение: используя ¹¹¹In в качестве радиоизотопной метки, нам удалось связать с АСУ, модифицированным хелатирующим полимером, до 95 мКи In на мг белка в сравнении с 1.5 мКи/мг белка в случае АСУ, традиционно модифицированного прямым введением остатков ДТПК. В зависимости от ММ с одной молекулой полимера может быть связано до 100 атомов металла, что было доказано измерением параметра *T* связанного иона Gd или γ -излучения ¹¹¹In, связанных с антителами [4]. В эксперименте по связыванию меченого ¹¹¹In антитела с монослоем антигена (рис. 3) было доказано, что связанное ¹¹¹In посредством ПЛЛ-ДТПК антитело способно доставлять к поверхности, покрытой антигеном, на 2 порядка

большую радиоактивность, чем соответствующее антитело, непосредственно модифицированное ДТПК, причем кинетика связывания остается неизменной. В этом эксперименте использовали монослои миозина из сердца собаки и соответствующий АСУ антитела антимиозина.

Нами также показано [15], что при определенных условиях модификации, связывающие антитела с комплексообразующим полимером, практически не влияют на обычные связывающие свойства антитела. Мы показали это для АСУ антимиозина с помощью твердофазного радиоиммуноанализа, используя в ТНБ модифицированный АСУ в качестве контроля. Более того, оказалось, что различия в химии связывания лишь слегка влияют на активность антитела в испытаниях по типу ELISA (на рис. 4 показаны данные для реакции связывания СМСК, СПДП и бромацетилирования). Однако максимальное снижение иммуноактивности антитела наблюдалось в том случае, когда реакцию связывания было труднее

всего контролировать (бромацетилирование). Тем не менее возможность использования различных путей связывания, приводящих к различным свойствам связи полимер-антитело, позволяет контролировать такие важные свойства этих агрегатов, как время выведения и биораспределение.

Использование хелатирующих полимеров для связывания с ионами металлов позволяет преодолеть некоторые общие трудности. Так, мечение белков и антител такими изотопами, как ^{99m}Tc и ^{186}Re обычно включает в себя сильное неспецифичное связывание ионов металлов, восстановленных из соответствующих MeO_4^- солей, с низкоаффинными связывающими центрами на молекуле белка.

Пытаясь решить эту проблему, мы предложили и развили "обратную" схему мечения антител изотопами Tc или Re посредством хелатирующих полимеров.

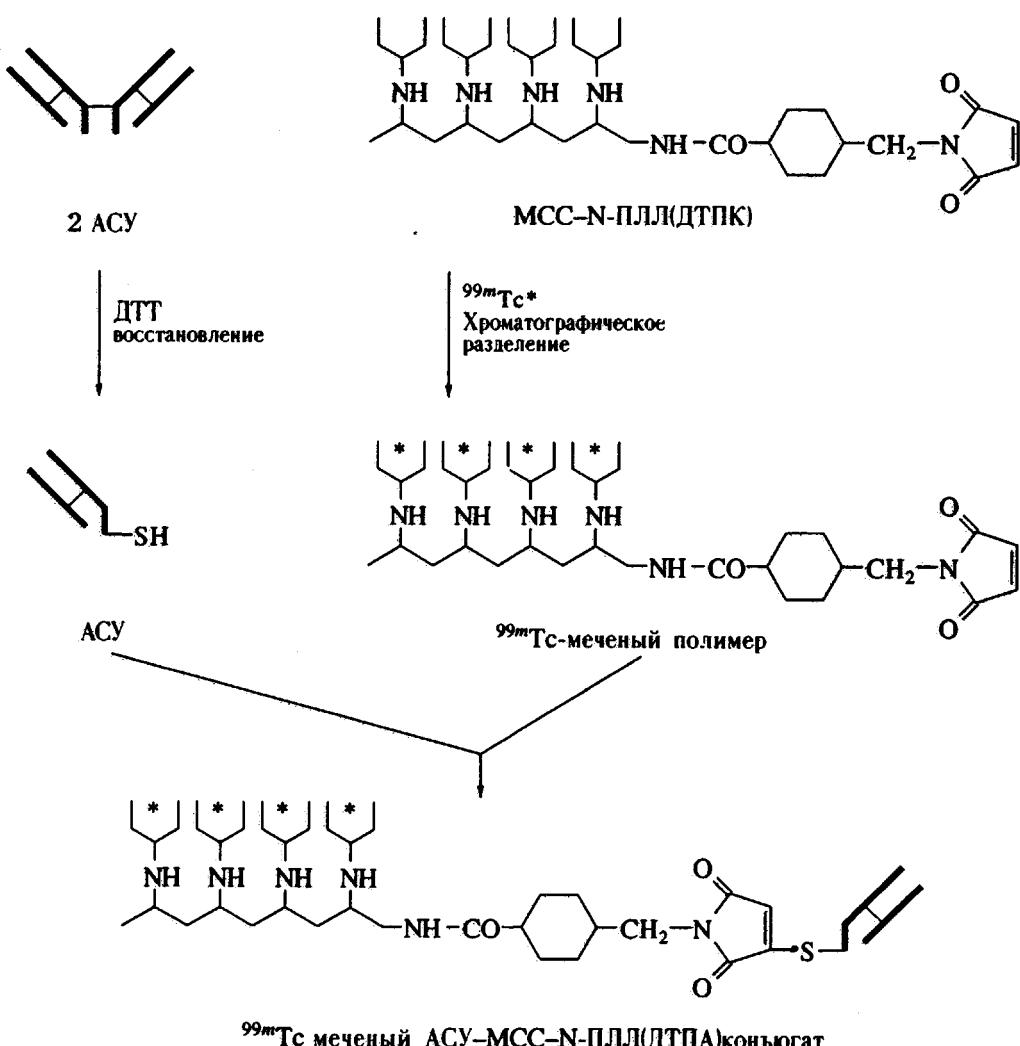


Схема 13



Рис. 2. Мечение ^{111}In конъюгата ДТПК-ПЛЛ-АСУ и АСУ, непосредственно модифицированного ДТПК [13].

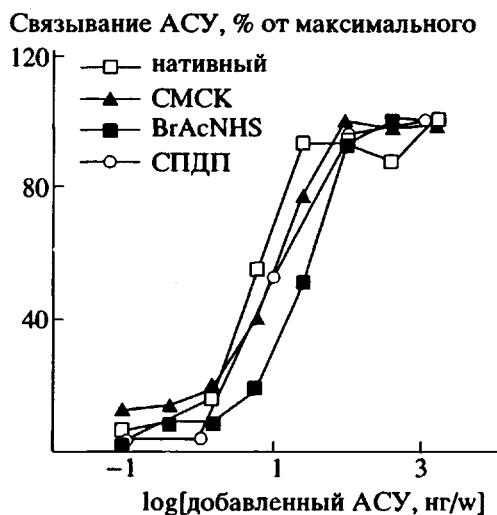


Рис. 4. Иммунная активность различных ДТПК-ПЛЛ-АСУ антимиозина конъюгатов *in vitro*. Получение препаратов проводилось согласно схеме 12. Связывание конъюгата с миозином устанавливали с помощью испытаний по типу ELISA.

Согласно этой схеме, в условиях восстановления хелатирующий полимер сначала связывают с радиоизотопами и после быстрой очистки от свободного металла на микроколонке в центрифуге конъюгируют с предварительно активированным антителом или его фрагментом (например, с восстановленным АСУ). Для случая связывания Тс весь процесс, строго доказанный нами, длится менее 2 ч и очень легок в осуществлении. Предварительные данные показывают эффективность мечения антитела и полное отсутствие неспецифически связанных Тс из-за малого числа неспецифических связывающих центров на полимере

с rpt ^{111}In -ПЛЛ-ДТПК-АСУ связанный, $\times 10^5$ (—□—)
с rpt ^{111}In -ПЛЛ-ДТПК-АСУ связанный, $\times 10^3$ (—●—)



Рис. 3. Доставка ^{111}In в антигеновый монослои посредством ДТПК-ПЛЛ-АСУ и ДТПК-АСУ (разные шкалы!). Использовались АСУ антитела моноклонального антимиозина и миозинового монослоя [13].

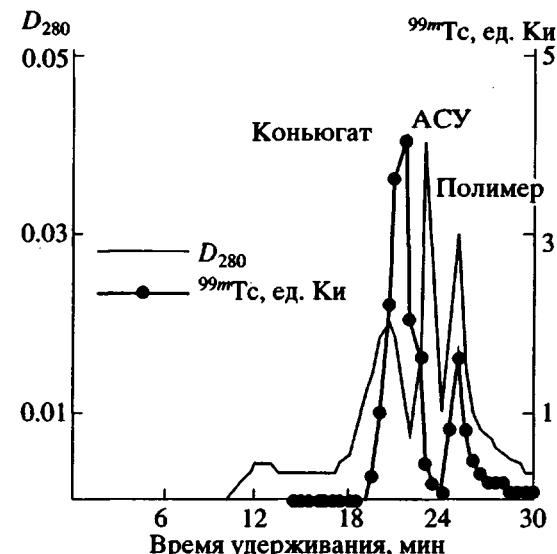


Рис. 5. Жидкостная хроматограмма реакционной смеси после связывания АСУ с ДТПК-ПЛЛ, меченным ^{99m}Tc .

(рис. 5): на жидкостной хроматограмме не наблюдается радиоактивности, соответствующей пику свободного АСУ. Предварительные исследования *in vitro* показали, что Тс-содержащий конъюгат полимер-антитело, полученный согласно описанной схеме, сохраняет иммунную активность и эффективность связывания со слоем антигена. Связывание может быть конкурентно ингибировано добавлением избытка "холодных" антител, что указывает на его специфичность.

Таким образом, полученные данные по химии синтеза комплексообразующих полимеров и их использование для модификации белков (анти-

тел) и мечения их радиоизотопами тяжелых металлов могут оказаться полезными для создания фармацевтических препаратов направленного действия, содержащих радиоизотопы тяжелых металлов диагностического и(или) терапевтического назначения.

Некоторые предварительные эксперименты на животных проведены с антителами, модифицированными полимерами. В ранних исследованиях, включающих в себя использование хелатирующих полимеров с многочисленными способными к связыванию с белком группами, редко распределенными по полимерной цепи, мы продемонстрировали быстрое и эффективное накопление радиоактивности антитела в зоне-мишени [16]. Для этой цели использовалась модель экспериментального инфаркта миокарда у кроликов; конъюгаты ПЛЛ-ДТПК, меченные ^{111}In , и АСУ R11D10 антитела антимиозина были введены внутривенно после 30 - 40-минутного тромбоза левой коронарной артерии и 30-минутной повторной перфузии. В качестве контроля использовали то же количество радиоактивного ^{111}In -связанного с АСУ R11D10 прямым хелатированием ДТПК. Идея эксперимента заключается в том, что антитело антимиозина не может достичь и связать антиген (миозин) в нормальных клетках, в которых он защищен клеточной мембраной. Однако в нарушенном миокардиуме мембранны кардиомиоцитов становятся проницаемыми, что приводит к внутриклеточному проникновению антитела и связыванию с антигеном. В результате антитела накапливаются в ишемической или инфарктной зоне и концентрируют там радиоактивную метку, связанную с антителом. Как гамма-радиография в течение эксперимента, так и локализация инфаркта в срезах сердца умерших животных показали быстрое и специфическое накопление радиоактивности в зоне-мишени в случае меченых конъюгатов полимер-антитело (рис. 6, 7).

Пытаясь и дальше увеличить локализационный эффект конъюгатов полимер-антитело (который может быть выражен соотношением радиоактивности мишени к радиоактивности нормальных клеток), мы проделали несколько экспериментов по изучению свойств конъюгатов антител и одноточечно активированных хелатирующих полимеров *in vivo* [15]. Эксперименты по удалению из крови и биораспределению их конъюгатов, проделанные на кроликах с экспериментальным инфарктом миокарда, позволили нам определить оптимальный способ связывания среди тех, что уже были использованы. Для сравнения мы использовали уже упомянутые методы связывания полимера с антителом: СПДП-, СМСК-, и бромацетил-промежуточное связывание. Данные, представленные на рис. 8 и 9, показывают, что конъюгация полимер-антитело с использованием СМСК приводит к наилучшим результатам в плане удаления из крови (самое

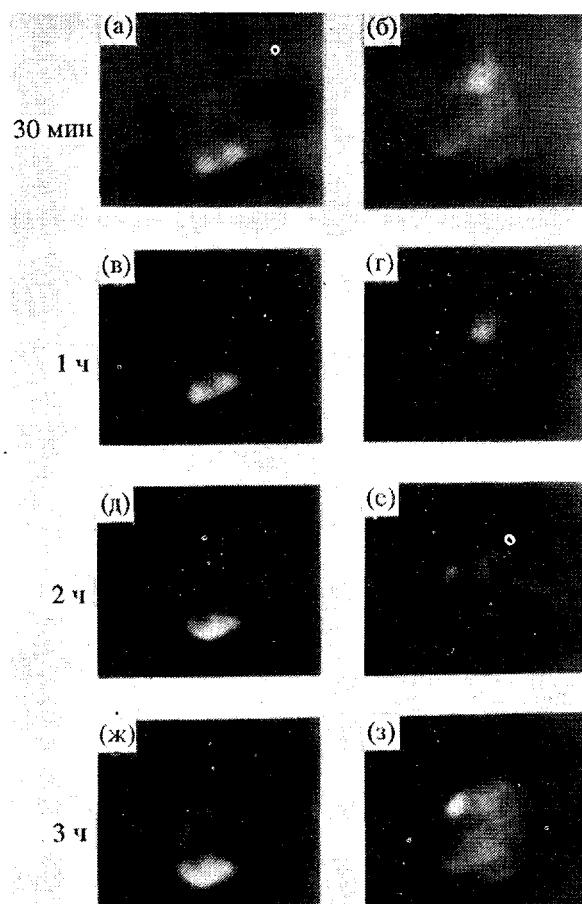


Рис. 6. Временной ход экспериментальной визуализации инфаркта у кролика с традиционно меченным ^{111}In АСУ антимиозина (левый ряд; после 3 ч не наблюдается накопления в зоне инфаркта, видна лишь активность печени) и с ^{111}In -ДТПК-ПЛЛ-АСУ конъюгатами (правый ряд; видна прекрасная локализация в зоне инфаркта через 3 ч – маленько яркое пятно, и небольшая активность печени). Исходная радиоактивность ^{111}In в обоих случаях одинакова. Данные получены в ядерной гамма-камере [16].

медленное) и накопления в печени и селезенке (самое низкое). Можно указать следующие причины для оптимальных свойств СМСК-конъюгата: в отличие от бромацетилирования СМСК-активация не вызывает сверхмодификации и потери активности, что приводит к минимальному накоплению в мишени и (в отличие от СПДП-активации, которая приводит к образованию гидролизующейся связи S-S между полимером и антителом) СМСК образует стабильную связь C-S, исключая таким образом отщепление радиоактивно меченого полимера от антитела и его накопление в печени и селезенке.

В дальнейших экспериментах мы попытались количественно оценить эффект специфического накопления конъюгата в зоне-мишени. Для этой

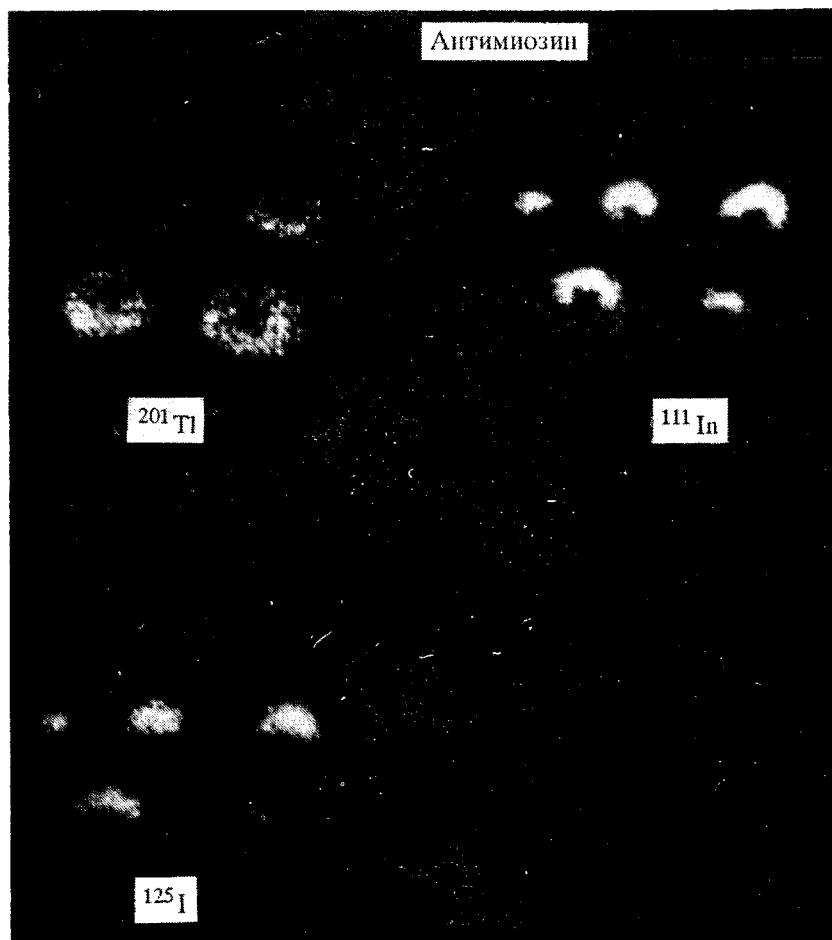


Рис. 7. Гамма-визуализация срезов сердца экспериментальных кроликов после смерти, полученная с использованием АСУ, меченных ^{201}Tl , ^{125}I (оба метода клинически апробированы для визуализации инфаркта) и ^{111}In -ДТПК-ПЛЛ-АСУ. Наиболее ясная картина видна в случае конъюгатов полимер-антитело. Инфаркт был гистологически подтвержден покрытием трифенилтетразолий хлоридом.

цели мы использовали экспериментальную разработку, предварительно описанную нами [17]. Кроликам с экспериментальным инфарктом миокарда вводили по-разному меченные антитела антимиозина, включая антитела, связанные с ^{111}In -ДТПК-ПЛЛ. Через 5 ч животные были декапитированы, сердца животных разрезали на несколько слоев и каждый слой покрывали ТТС для гистохимической визуализации зон инфаркта. Затем срезы были разрезаны на сегменты, радиоактивности которых определены с помощью гамма-счетчика. После этого было подсчитано и нанесено на график для каждого образца ткани соотношение радиоактивности инфаркт/норма. Было найдено, что некоторые образцы ткани животных, получивших конъюгаты хелатирующий полимер-антитело, показывают очень высокое соотношение инфаркт/норма, что всегда совпадало с положительным результатом ТТС покрытия. Величина этого соотношения зависит от степени некротизации (омертвения) инфарктных кусочков, она варьировалась от 8 до

100 и более. Причина этого заключается в трудности приготовления образцов, содержащих только инфарктные ткани и образцов из инфарктной периферии, содержащих много нормальных клеток, не накапливающих радиоактивно меченный комплекс полимер-антитело. В то же время в случае традиционного синтеза ДТПК-АСУ (прямое мечение) отношение радиоактивности даже в самых омертвевших образцах обычно не превышает нескольких единиц. Таким образом, использование конъюгатов хелатирующий полимер-антитело, меченых радиоактивным металлом, позволяет быстро и эффективно аккумулировать метку в зоне-мишени с соотношением мишень : норма ~100.

Для доказательства общей зависимости обсуждаемого подхода нами также проведено несколько предварительных экспериментов на мышах с имплантированной грудной опухолью человека. В этом случае 323 антитела против опухоли груди человека были связаны с активированным по конечной группе ПЛЛ-ДТПК с M_w порядка 18000, меченых ^{111}In . Полученный

конъюгат вводили в хвостовую вену экспериментальных животных и через 24 ч после инъекции сканировали в гамма-камере. Полученные результаты, представленные на рис. 10, показывают, что введенная радиоактивность концентрируется в печени и многочисленных кровеносных судах растущей опухоли. Введение меченого конъюгата в некротическую область опухоли было существенно менее заметно, возможно, вследствие деструкции соответствующего антигена.

Основные описанные химические методы могут быть применены и к некоторым другим системам, представляющим практический интерес. В последнее время были проведены исследования по связыванию хелатирующего полимера с липосомами с целью получения систем для направленной доставки радиодиагностических и радиотера-

певтических изотопов в лимфоузлы, которые являются естественными мишениями для липосом, введенных подкожно [18]. Основная идея в этом случае заключалась в том, чтобы увеличить число комплексно-связанных атомов Gd, присоединенных к единичному липидному якорю, способному встраиваться в мембрану липосомы. Следуя этому методу, можно существенно увеличить число мембранных связанных атомов Gd на везикулу, что в свою очередь позволит уменьшить дозу контрастного реагента без угрозы потери интенсивности визуального сигнала. Для получения фосфолипидзамещенных комплексообразующих полимеров (например, полимеров, модифицированных N-глутарилфосфатидилэтаноламином-НГФЭ), которые способны легко встраиваться в мембрану липосомы, разработана следующая схема превращений:

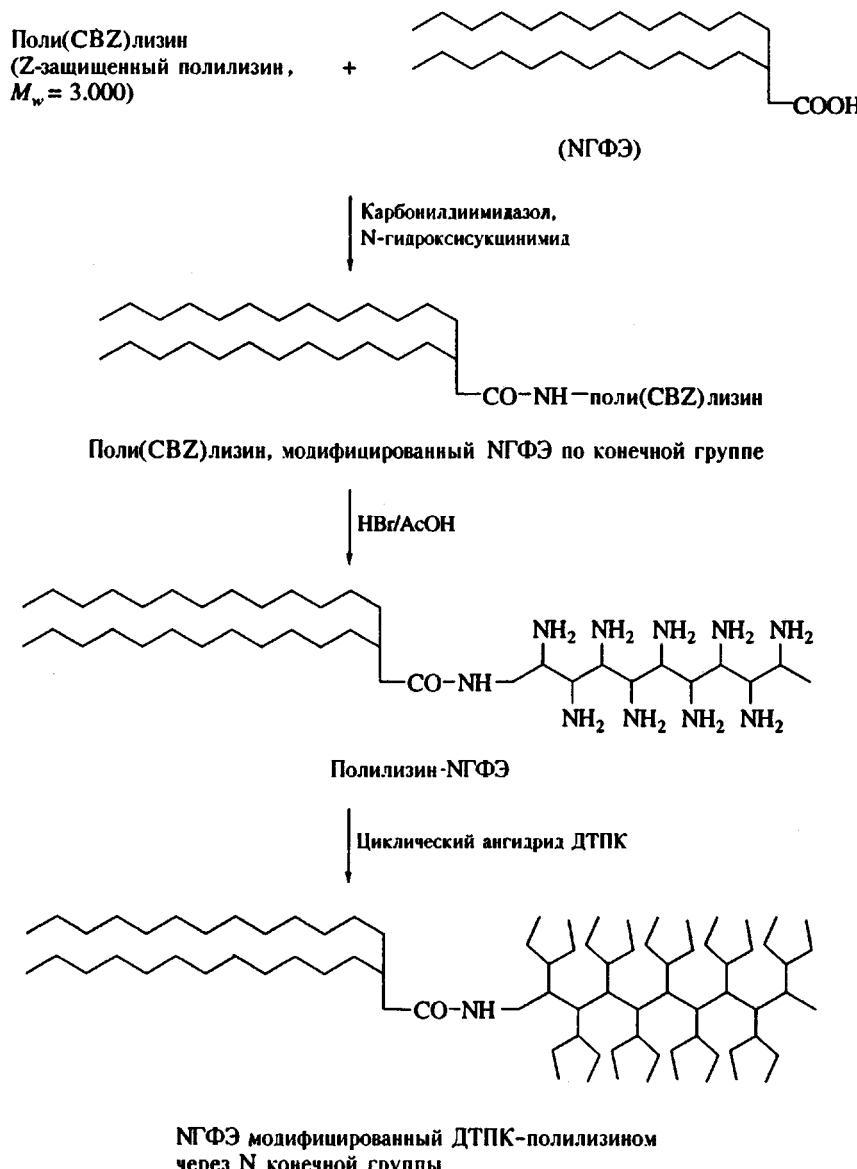


Схема 14

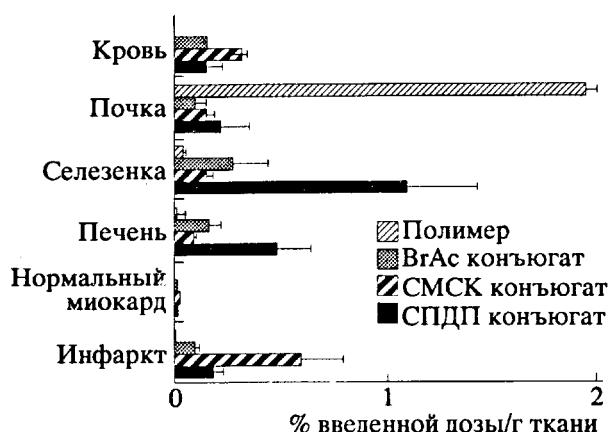


Рис. 8. Биораспределение различных конъюгатов ^{111}In -ДТПК-ПЛЛ-АСУ антимиозина у кроликов с экспериментальным инфарктом миокарда (5 ч после инъекции, 3 - 5 животных в группе). Конъюгаты получены согласно схеме 12.

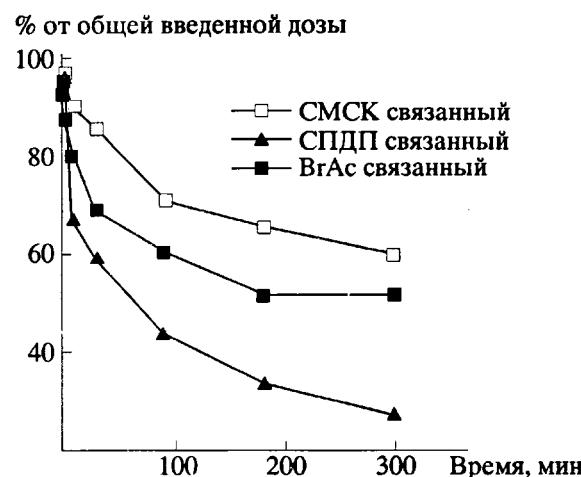


Рис. 9. Очистка крови от различных конъюгатов ^{111}In -ДТПК-ПЛЛ-АСУ у кроликов с экспериментальным инфарктом миокарда (3 - 5 животных в группе).

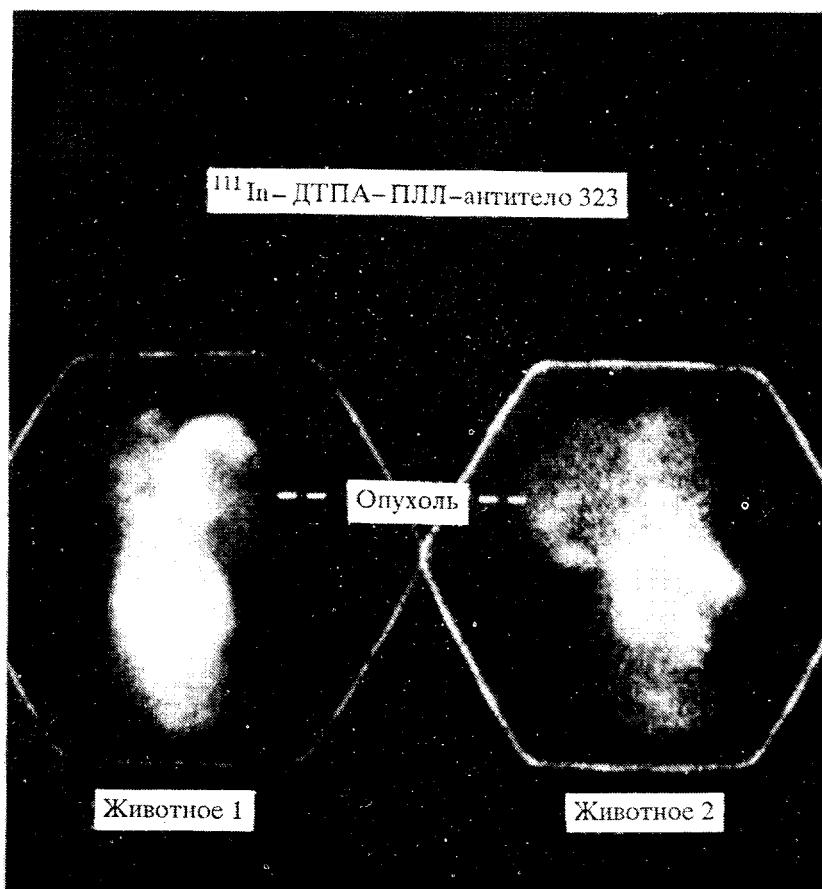


Рис. 10. Гамма-визуализация грудной опухоли человека, имплантированной мышам через 24 ч после инъекции. Визуализация была получена с конъюгатами, меченными ^{111}In между ДТПК-ПЛЛ и противоопухолевым моноклональным антителом 323, используя коллиматор с тончайшим отверстием.

При введении в двойной слой НГФЭ-якорь, завершающийся комплексообразующим полимером, должен образовывать покрытие из комплексно-связанных атомов металла вокруг мемб-

раны липосомы. Эти атомы металлов расположены непосредственно в наружном и внутреннем водном окружении, что должно увеличивать прочность парамагнитных ионов. В результате гораздо

большее число ионов металлов может быть связано с липосомой, чем каким-либо другим методом [19]. Для доказательства способности липосом, связанных с тяжелыми металлами через хелатирующий полимер, доставлять металл-метку в лимфоузлы при подкожной инъекции, мы использовали метод ЯМР и конъюгаты липосома-хелатирующий полимер, меченный Gd [20]. Сравнение удерживающих свойств липосом, содержащих Gd, связанный с липосомами различными способами (введением во внутреннее пространство липосом в качестве части растворимого комплекса с комплексообразователем, комплексообразованием с включенной в липосому единственной группой комплексообразователя ДТПК-fosfatidилэтаноламин (ДТПК-ФЭ) или ДТПК-стеариламин (ДТПК-СА) и ассоциацией с введенным в мембрану хелатирующим полимером) показало значительно лучшее удерживание в случае систем липосома-полимер, связанный с Gd (рис. 11). Для доказательства эффективности липосом Gd-ДТПК-ПЛЛ-НГФЭ как МР-контрастирующих агентов *in vivo* нами проведены визуализация лимфоузлов кролика, используя подкожное введение 10 мг липосом яичный ФХ-холестерин (75 : 25), содержащих 5 мол. % Gd-ДТПК-ПЛЛ-НГФЭ. Поперечное сканирование радиометром 1.5 Тл GE Sigma (сильная пульсация, жироподавляющие условия) показало, что аксилярные и надкапиллярные лимфоузлы могут быть видны на сканирующем устройстве уже через 5 мин после инъекции, доказывая таким образом пригодность препарата для быстрой МР-визуализации лимфатических узлов (рис. 12).

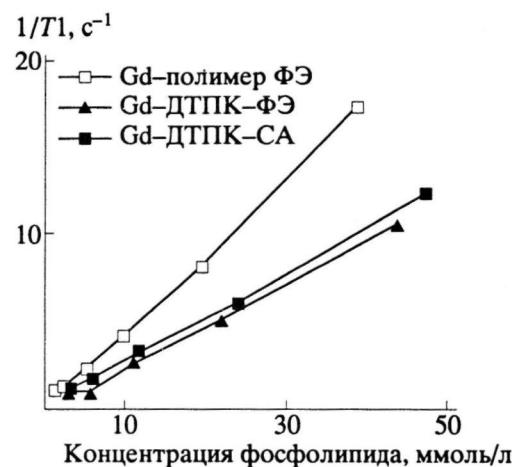


Рис. 11. Различные способы получения Gd-содержащих липосом. Молярная фракция Gd-содержащих липидов во всех случаях одинакова, однако возможности липосом с полимерным комплексообразователем заметно выше из-за большего количества атомов Gd, связанных с единичным липидным остатком.

Чтобы понять, что представляют собой центры накопления такого рода липосом после внутривенного введения, липосомы Gd-ДТПК-ПЛЛ-НГФЭ были помечены ¹¹¹In и введены кролику с последующим наблюдением за распределением метки в гамма-камере. Радиограмма, снятая через 2 ч после инъекции, показала обычные центры накопления липосом: печень, селезенку и костный мозг. Однако разнообразие органов, которые могут быть визуализованы благодаря использованию предлагаемого соединения, не ли-

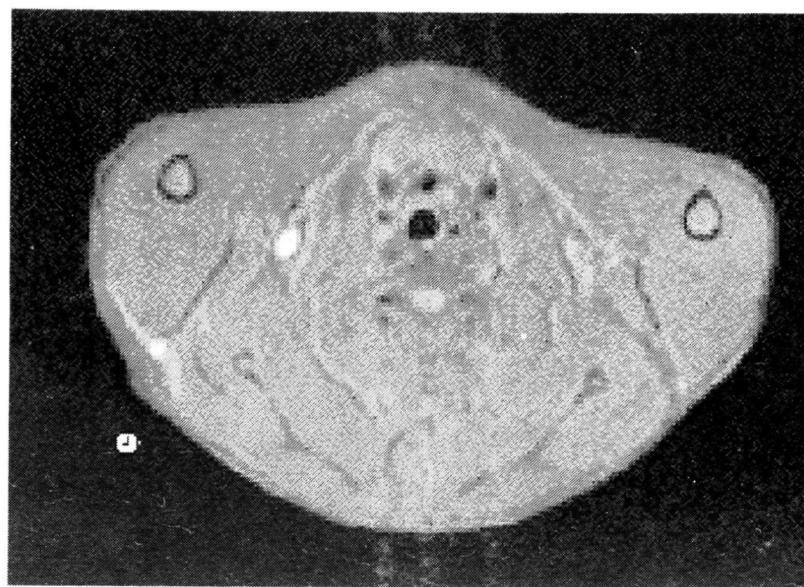


Рис. 12. МР-визуализация аксилярных (надкапиллярных) лимфатических узлов кролика (два ярких пятна на изображении) с помощью Gd-ДТПК-ПЛЛ липосом.

митировано описанными выше. Контрастирование других органов может быть достигнуто направленным транспортом Gd-ДТПК-ПЛЛ-НГФЭ липосом с антителом в качестве промежуточного звена [17].

Таким образом, комплексообразующие полимеры могут быть с успехом использованы для различных диагностических (и, возможно, терапевтических) целей. Они способны образовывать комплексы со многими атомами тяжелых металлов, связываются с антителами и другими белками, и могут резко увеличивать их емкость по ионам металлов и соответственно эффективность действия.

Новый класс описанных нами амфи菲尔ных комплексообразующих агентов может найти широкое применение в диагностике и терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larson S.M., Carrasquillo J.A., Reynolds J.C. // Cancer Invest. 1984. V. 2. P. 363.
2. Radiolabelled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy / Ed. by Srivastava S.C. New York: Plenum Press, 1988.
3. Paik C.H., Ebbert M.A., Murphy P.R., Lassman C.R., Reba R.C., Eckelman W.C., Pak K.Y., Powe J., Steplewsky Z., Koprowski H. // J. Nucl. Med. 1983. V. 24. P. 1589.
4. Torchilin V.P., Klibanov A.L., Nossiff N.D., Slinkin M.A., Strauss H.W., Haber E., Smirnov V.N., Khaw B.A. // Hybridoma. 1987. V. 6. P. 229.
5. Torchilin V.P., Khaw B.A., Klibanov A.L., Slinkin M.A., Haber E., Smirnov V.N. // Bull. Exper. Biol. Med. (Russ.) 1986. V. 102. P. 63.
6. Manabe Y., Longley C., Furmanski P. // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 883. P. 460.
7. Shreve P., Aisen A.E. // Magn. Res. Med. 1986. V. 3. P. 336.
8. Torchilin V.P., Klibanov A.L., Slinkin M.A., Danilov S.M., Levitsky D.O., Khaw B.A. // J. Contr. Release. 1989. V. 11. P. 297.
9. Spivakov B.Ya., Geckeler K., Bayer E. // Nature. 1985. V. 315. P. 313.
10. Cole W.C., DeNardo S.J., Meares C.F., McCall M.J., DeNardo G.L., Epstein A.L., O'Brien H.A., Moi M.K. // J. Nucl. Med. 1987. V. 23. P. 83.
11. Krejcarek G.E., Tucker K.L. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1977. V. 77. P. 581.
12. Torchilin V.P., Klibanov A.L. // CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carriers System. 1991. V. 7. P. 275.
13. Slinkin M.A., Klibanov A.L., Torchilin V.P. // Bioconjugate Chem. 1991. V. 2. P. 342.
14. Torchilin V.P., Trubetskoy V.S., Narula J., Khaw B.A., Klibanov A.L., Slinkin M.A. // J. Contr. Release. 1993. V. 24. P. 111.
15. Trubetskoy V.S., Narula J., Khaw B.A., Torchilin V.P. // Bioconjugate Chem. 1993. V. 4. P. 251.
16. Khaw B.A., Klibanov A., L'Donnell S.M., Saito T., Nossiff N., Slinkin M.A., Newell J.B., Strauss H.W., Torchilin V.P. // J. Nucl. Med. 1991. V. 32. P. 1742.
17. Torchilin V.P., Klibanov A.L., Huang L., O'Donnell S., Nossiff N.D., Khaw B.A. // FASEB J. 1992. V. 6. P. 2716.
18. Khato J., Adamson R.H., Priester E.R., Sieber S.M. // Proc. Am. Ass. Cancer. 1981. V. 22. P. 240.
19. Tilcock C. // Liposome Technology / Ed. by Gregoriadis G. CRC Press, Boca Raton, 1993. V. 2.
20. Trubetskoy V.S., Canillo J., Wolf G.L., Torchilin V.P. (submitted for publication).

Chelating Polymer-Based Immunoconjugates: New Agents for Diagnostic Imaging

V.P. Torchilin

*Center for Imaging and Pharmaceutical Research, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School,
149, 13th Street, Charlestown, Massachusetts 02129, USA*

Abstract – New family of polymers is synthesized for labeling proteins (antibodies) with multiple heavy metal ions for the use in gamma- and MR-imaging. Polylysine of different molecular weight was used in the majority of experiments, modified with multiple chelating moieties such as diethylenetriamine pentaacetic acid. The modification permits to introduce in a single polymer molecule ($M_w = 55$ kDa) up to 100 chelating units able to firmly bind metals such as In, Gd, Mn, Tc, Re and others, which are widely used in radioscintigraphy and NMR-tomography. To make polymeric chelates specific towards target areas, they were conjugated with monoclonal antibodies. Special technique of antibody modification with chelating polymers was developed, permitting to bind whole antibody or its Fab fragment with the polymer via minimal number of covalent bonds and with minimal loss in immunoreactivity. In vitro studies with radiometals demonstrated extremely high labeling efficacy of antibody: in case of ^{111}In the specific radioactivity achieved was up to 100 mCi per mg protein in comparison with 3 to 5 mCi per mg as obtained using traditional labeling protocols. In vivo studies in rabbits with experimental myocardial infarction and in mice with implanted human breast tumor demonstrated fast and quantitative label accumulation in target areas. Amphiphilic derivatives of chelating polymers have been synthesized able to incorporate into phospholipid membranes. Liposomes with surface-incorporated Gd-loaded chelating polymers have been successfully used for MR-imaging of lymph nodes in rabbits.