

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616.875+615.549.463

©Коллектив авторов

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕКТОРНОЙ ПЭГИЛИРОВАННОЙ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНОЙ ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ, СПЕЦИФИЧНОЙ ДЛЯ АСТРОЦИТОВ НЕРВНОЙ ТКАНИ.

*В. П. Чехонин¹, Ю. А. Жирков¹, О. И. Гурина¹, С. В. Лебедев¹, Т. Б. Дмитриева¹,
А.В. Семенова², Т.В.Яглова², А.Е.Рябина²*

¹Лаборатория иммунохимии ВНЦ ССП им. В.П.Сербского, 119839 Москва, Кропоткинский пер., 23; тел : 007 (095) 202-28-13, 798-82-69;

факс: 007 (095) 201-50-55, эл. почта: chekhonin@aport.ru

²Институт белка РАН, Пущино на Оке

Приготовлен препарат ПЭГилированных иммунолипосом, ковалентно связанных с моноклональными антителами D4, специфичными к человеческому глиофибрилярному кислому протеину (GFAP). Конъюгирование осуществлялось с образованием тиоэфирной связи между малеимидным производным фосфатидилэтаноламина, включенным в состав липосомной мембраны, и тиолированными антителами. В зависимости от исходного соотношения компонентов иммунолипосомы диаметром около 70 нм содержали от 60 до 240 молекул антител к GFAP. Иммунолипосомальные транспортные контейнеры специфически связывались с культивированными астроцитами из эмбрионального мозга крысы, при этом преинкубация клеток со свободными нативными антителами к GFAP (но не с неспецифическими антителами) предотвращала последующее связывание иммунолипосом. Фармакокинетика полученного препарата липосом после их внутривенного введения крысам соответствовала типичным кинетическим профилям ПЭГилированных липосом через сутки после введения в системном кровотоке оставалось еще около 20% от введенной дозы (период полужизни 8-15 часов).

Ключевые слова: иммунолипосомы, эмбриональные астроциты, моноклональные антитела, GFAP, клеточные культуры, иммунофлуоресцентный анализ, фармакокинетика

ВВЕДЕНИЕ. Создание систем, способных осуществлять специфический направленный транспорт лекарственных средств из системного кровотока к клеткам центральной нервной системы (ЦНС), является одной из самых насущных проблем нейрофармакологии. Однако приходится с сожалением признать, что окончательное решение этой проблемы пока не достигнуто. В методологическом

отношении она разделяется на три основные задачи: во-первых, создание надежной контейнерной системы, способной прочно удерживать транспортируемое лекарственное средство и эффективно высвободить его в месте назначения; во-вторых, подбор специфических векторов, обеспечивающих селективное связывание транспортной системы с клетками-мишенями; и, в-третьих, преодоление гематоэнцефалического барьера. Последняя из этих задач в настоящее время представляется наиболее сложной, и для своего будущего решения она, по-видимому, потребует весьма изощренных методических приемов [1-6]. Однако в некоторых случаях эта проблема отходит на задний план — например, при патологических нарушениях целостности гематоэнцефалического барьера (в частности, при опухолях головного мозга), когда задача его преодоления в очаге поражения практически снимается и когда первостепенной становится проблема специфичности векторного компонента транспортной системы и надежности ее контейнерной конструкции. В решении этих последних проблем достигнут уже более существенный прогресс — с началом использования ПЭГилированных, или “стелс” (англ. “stealth”) липосом, обеспечивающих достаточно длительное системное циркулирование липосомных контейнеров, способных надежно удерживать как водорастворимые, так и липофильные лекарственные препараты и радикальным образом повышать их фармакокинетическую эффективность, а также с разработкой надежных способов конъюгирования липосом с иммунохимическими векторами (чаще всего — с соответствующими антителами), обеспечивающими специфичность всей транспортной системы.

В наших более ранних экспериментах в этой области [7-9] в качестве векторов мы использовали поликлональные моноспецифические антитела (и их нативные и гидрофобизованные Fab-фрагменты) к некоторым нейроспецифическим белкам. При этом была показана их достаточно высокая эффективность. В настоящее время мы располагаем возможностями по приготовлению препаратов моноклональных антител к нейроспецифическим белкам [7, 10], и в данной работе один из таких препаратов (моноклональные антитела D4 к человеческому GFAP — глиофибриллярному кислому белку) был опробован в качестве потенциального вектора для стелс-иммунолипосомной транспортной системы, обеспечивающего ее специфическое связывание с клетками-мишенями — культивируемыми эмбриональными астроцитами мозга крысы.

МЕТОДИКА. *Приготовление ПЭГилированных иммунолипосом.* При приготовлении липосом мы взяли за основу процедуру, изложенную в статье нидерландской группы [11], несколько модифицировав ее в соответствии с целями данной работы. В качестве модельного транспортируемого средства использовался искусственный гептапептид Lys-Tyr-Lys-Pro-Lys-Tyr-Asp, меченный ^{125}I по фенильным кольцам остатков тирозина, синтезированный в Институте белка РАН (Пушкино-на-Оке).

Для приготовления иммунолипосом использовали следующие липидные компоненты: лецитин (пальмитоиллецитинфосфатидилхолин) из желтков куриных яиц; холестерин; DSPE (дистеароилфосфатидилэтанолламин), конъюгированный с ПЭГ-2000 (цепочкой полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000, присоединенной к этаноламинной группе липида); MPB-PE, малеимидо-4-(п-фенилбутирил)-фосфатидилэтанолламин. В молекуле последнего малсимида группа присоединена через фенилбутиратный мостик к этаноламинной группе липида; после формирования липосом этот компонент служит для химического связывания с векторным белком (антителом). Все эти липидные компоненты были получены от фирмы “Avanti Polar Lipids” (Alabaster AL, США) в следующем виде: лецитин — раствор в хлороформе в концентрации 10 мг/мл; холестерин — твердая порошкообразная субстанция; DSPE — раствор в хлороформе в концентрации 50 мг/мл; MPB-PE — раствор в хлороформе в концентрации 25 мг/мл. Все препараты липидов хранили в атмосфере аргона при -20°C .

Остальные химические реактивы, растворители и вспомогательные материалы были получены из следующих источников: 2-иминотиолан, N-этилмалеимид, HEPES (N-2-гидроксипиперазин-N'-2-этансульфоокислота), безводный сульфат натрия, хлорид натрия, безводный гидроксид натрия, сефадекс G-25 superfine, тиоцианат аммония, гексагидрат хлорида железа — от фирмы "ICN" (США); флуоресцентный индикатор Dil (1,1'-октадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат) и сефароза CL-4B — от фирмы "Fluka" (Швейцария); дигидраты одно- и двузамещенных фосфатов натрия и калия, сцинтилляторы POP и POPOR, тритон X-100 — от фирмы "Serva Feinbiochemica" (Германия); хлороформ, метанол, толуол и циклогексан — от фирмы "Aldrich" (США); набор реактивов для определения белка — от фирмы "Pierce" (США). Все реактивы были максимально возможной степени чистоты.

Все манипуляции по приготовлению липосом (за исключением кратковременных — взвешивание и т.п.) проводили в атмосфере аргона высокой чистоты, поставляемого ОАО Балашихинский кислородный завод.

Отобранные в соответствии с расчетом количества лецитина, холестерина, MPB-PE, PEG-DSPE и Dil растворяли (или разводили — если они изначально были получены в виде растворов) в смеси хлороформа с метанолом (9 : 1) в концентрации ~10 мг суммарных липидов в 1 мл растворителя в молярном отношении 23 : 16 : 1 : 1,6 : 0,4. Эту смесь высушивали на роторном испарителе Laborata 4000, оснащенном автоматическим мембранным вакуумным насосом Rotavac Control ("Heildolph Instruments", Schwabach, Германия) при пониженном давлении аргона (начальное давление ~300 мБар, конечное — 40 мБар). Сухую липидную пленку растворяли в абсолютном циклогексане (добавляемом в количестве, необходимом для получения раствора с концентрацией общих липидов около 15 мг/мл), замораживали в жидком азоте и подвергали лиофилизации (лиофильная сушка LP35, "Jouan", Франция).

Лиофилизованную смесь липидов эмульгировали в растворе ^{125}I -меченного гептапептида в буфере гидратации (0,01 M HEPES с 0,135 M NaCl, либо 0,1 M Na-фосфатный буфер, либо PBS, pH ~ 7,5). При этом учитывали степень включения пептида в липосомы: теоретически, в отсутствие избирательного аккумуляирования, эта величина равна той доле общего объема системы, которую занимает внутренний объем липосом; при концентрации липосомной эмульсии, приготовляемой в данной работе (50 мг общих липидов в 1 мл), она не могла превосходить 20%. Необходимо было также принимать во внимание возможные потери на последующих стадиях ультрафильтрационного концентрирования и гельфильтрации (не менее 15-30% на каждой стадии). Соответственно рассчитанные количества лиофилизованной липидной смеси и буферного раствора пептида смешивали на вращающемся блоке роторного испарителя. При этом сначала получали предварительную эмульсию больших липидных пузырьков, охватывающих липидными слоями довольно большие капли водного раствора пептида; для созревания эта эмульсия оставлялась вращаться на роторе до следующего дня.

После этого эмульсию обрабатывали в специальном ультразвуковом дезинтеграторе, предназначенном для приготовления липосом (G112SP1 Special Ultrasonic Cleaner, "Laboratory Supplies Company", Hicksville, NY, США). Эту обработку проводили в четыре сеанса по 15 минут с 20-минутными перерывами. Затем смесь 13 раз пропускали через поликарбонатный мембранный фильтр ("Nucleopore") с размером пор 50 нм с помощью ручного минизэкструдера ("Avanti Polar Lipids"). При этом происходило калибрование липосом, при котором они делались значительно мельче, а их распределение по размерам становилось достаточно узким. По данным работы [11], получаемые таким образом липосомы (до и после конъюгирования с белком) имеют диаметр около 70 и 100 нм соответственно.

После этого от загруженных липосом отделяли пептид, не включенный в

ПЭГИЛИРОВАННАЯ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ СИСТЕМА

липидные пузырьки. Это осуществляли с помощью гель-фильтрации через сефадекс G-25 (superfine) на колонке размером $\sim 1 \times 50$ см, уравновешенной рабочим буфером. За ходом гельфильтрации удобно следить по движению флуоресцентного липидного индикатора (Dil), интенсивно окрашенного в малиново-красный цвет. Эффективность разделения может быть проконтролирована по профилю элюции радиоактивной метки: первыми (с фронтом элюции) выходят меченные липосомы (окрашенные флуоресцентным индикатором), за ними следует сравнительно широкая неокрашенная фракция свободного пептида, после которого выходят остатки неорганического ^{125}I , не присоединенного к молекуле пептида при его йодировании (рис. 1).

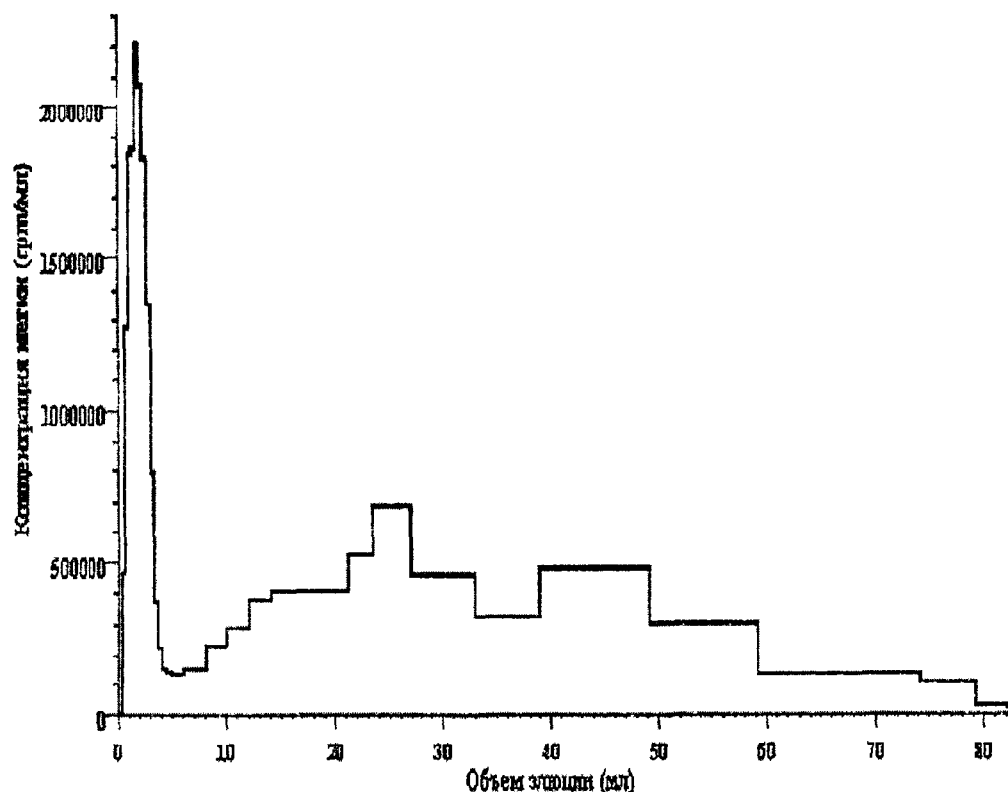


Рисунок 1.

Гель-фильтрация 0,15 мл эмульсии ПЭГилированных липосом (суммарное количество липидов — 7,5 мг) после гидратации с раствором ^{125}I -меченного гептапептида, обработки ультразвуком и экструзии (но до конъюгирования с антителами) через колонку с сефадексом G-25 (superfine) 1×47 см, уравновешенную 10 mM Na-фосфатным буфером pH 7,4, при скорости элюции 16 мл/час.

Полученная таким образом липосомная эмульсия оказывается довольно сильно разбавленной (в 20-30 раз). Поэтому ее необходимо сконцентрировать до объема, близкого к первоначальному (не более 0,5-1 мл). В данной работе это осуществлялось ультрафильтрацией через конические мембраны CentriFlo CF50 ("Amicon", Голландия), при центрифугировании при 1000g.

Приготовленные липосомы конъюгировали с белком по методике, описанной в работе [12]. В качестве специфического векторного белка использовались моноклональные антитела D4 к GFAP из ткани мозга человека, приготовленные в нашей лаборатории [10]. В качестве отрицательного контроля применяли

препараты моноклональных анти-NSE антител из ткани мозга человека, а также неспецифического мышинового иммуноглобулина G (IgG).

Молекулы белка перед связыванием с липосомами тиолировали (вводили в них дополнительные свободные сульфгидрильные группы). Для этого к раствору антител (1-5 мг в 1 мл рабочего буфера) добавлялся реактив Траута (2-иминотиолан в виде раствора с концентрацией 1-10 мг/мл в том же буфере) в количестве 1 мг на 1 мг белка, и смесь в течение часа инкубировали при комнатной температуре (в темноте и в атмосфере аргона, чтобы избежать окисления введенных сульфгидрилов и возможных побочных реакций неспецифического конъюгирования). После этого реакция тиолирования останавливалась посредством разделения белка и тиолирующего агента — перенесением реакционной смеси на колонку с сефадексом G-25 (superfine) (1×17 см), уравновешенную 0,1 М Na-фосфатным буфером pH 7,4 (этим же буфером антитела и элюировали при скорости около 20 мл/час). Тиолированный белок немедленно использовали для конъюгирования с липосомами. Точно так же и липосомы, содержащие малеимидные группы, использовали сразу же после приготовления, поскольку малеимидные группы в водных растворах могут подвергаться гидролизу (хотя и медленному, но все же заметному). Для конъюгирования с белком липосомы инкубировали с антителами не менее 12 часов при pH 7,6 и 4°C в темноте. Реакцию останавливали введением 100-кратного молярного избытка (по отношению к белку) N-этилмалеимида, который блокирует оставшиеся несвязанными сульфгидрилы. После этого реакционную смесь концентрировали до минимального объема (~0,5 мл) ультрафильтрацией через мембранные фильтры CentriFlo CF50, и иммунолипосомы отделяли от остальных компонентов реакционной смеси гельфильтрацией на колонке с сефарозой CL-4B (~1×50 см), 20 mM HEPES-буфером pH 7,4, содержащим 130 mM NaCl.

Полученные препараты липосом анализировали на содержание суммарных фосфолипидов (с роданидом железа [13], после экстракции липидов из водной фазы) и на общее количество связанного векторного белка (с бигинхониновой кислотой — реактив ВСА от фирмы "Pierce", после отделения от липидной фазы по методу [14]; калибровка по неспецифическому мышинному IgG), а также на содержание пептида, включенного в липосомы (по счету его ¹²⁵I-радиоактивности в гамма-счетчике 1260 MultiGamma, "LKB", Швеция); определялись также их фармакокинетические свойства при внутривенном введении крысам. Они также использовались в экспериментах по проверке их специфического связывания с клетками-мишенями — культивируемыми эмбриональными астроцитами мозга крысы.

Определение скорости системной элиминации полученных препаратов при внутривенном введении крысам. Эксперименты состояли в сравнении скоростей системной элиминации меченного пептида после его болюсного внутривенного введения крысам в свободном виде и в форме, включенной в ПЭГилированные иммунолипосомы. Опыты проводили на 20 самцах крыс Wistar с массой тела 300-500 г, разделенных на две группы. Животным первой группы (8 особей) вводили по 0,54 мкКи меченного свободного пептида в 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия; каждой из 12 крыс второй группы вводили по 0,38 мкКи меченного пептида, включенного в ПЭГилированные липосомы в 0,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,4 (по 2,3 мкмоль общих липидов на одно животное); препарат липосом вводили крысам через сутки после его приготовления. Введение препаратов и отбор проб крови (0,2-1,0 мл) осуществляли через бедренные вены под кетаминным наркозом (80 мг кетамина на кг массы тела, внутривенно). Все отобранные образцы просчитывали на гамма-счетчике.

Анализ кинетики меченного пептида в крови крыс проводили методом нелинейной регрессии с аппроксимацией результатов измерений различными экспоненциальными функциями, обычно используемыми при фармакокинетическом анализе. При этом наилучшая степень приближения наблюдалась при использовании двухкомпарментной модели (с формальным

ПЭГИЛИРОВАННАЯ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ СИСТЕМА

разделением организма на центральный и периферический компартменты); как известно, при этой модели кинетика препарата в крови описывается биэкспоненциальными функциями вида: $C = C_0^{расп} \exp(-k_{расп}t) + C_0^{эл} \exp(-k_{эл}t)$, где C — текущая концентрация метки в крови (срм/мл); $C_0^{расп}$ — параметр этого уравнения, формально равный начальной концентрации для фазы распределения между центральным и периферическим компартментами при $t = 0$ (срм/мл); $C_0^{эл}$ — параметр уравнения, формально равный начальной концентрации фазы элиминации (срм/мл); $k_{расп}$ — параметр уравнения, формально равный эффективной константе скорости распределения между центральным и периферическим компартментами (час⁻¹); $k_{эл}$ — параметр уравнения, формально равный эффективной константе скорости элиминации препарата из системного кровотока (час⁻¹). Для сопоставления результатов различных кинетических экспериментов результаты нормализовывали. При этом текущие концентрации выражали в процентах от формальных начальных концентраций, рассчитанных для каждого опыта по соответствующим уравнениям регрессии для двухкомпартментной модели: $C_0 = C_0^{расп} + C_0^{эл}$. Для соответствующих формальных кинетических стадий рассчитывались также значения периодов полураспределения ($T_{1/2}^{расп} = 0,693/k_{расп}$ часы) и полуэлиминации ($T_{1/2}^{эл} = 0,693/k_{эл}$ часы). Регрессионный анализ проводили с помощью пакета статистических программ Prophet 5.0 ("BBN Systems and Technologies", NIH, США). Во всех случаях регрессионного анализа рассчитанные параметры биэкспоненциального уравнения были статистически очень высоко значимыми (вероятность нулевых гипотез не превышала 0,0001, при коэффициенте определенности R^2 , превосходившем 0,99).

Культура эмбриональных астроцитов мозга крысы. Культуры эмбриональных астроцитов мозга крысы получали в нашей лаборатории по процедуре, описанной в [15-17] и модифицированной в соответствии с целями данной работы. Клетки для культивирования выделяли из головного мозга 16-дневных эмбрионов крыс линии Wistar путем трипсинизации фрагментов ткани, острожно гомогенизировали и отмывали. После чего клетки высевали на покровные стекла, предварительно обработанные поли-L-лизинном (~250000 клеток на каждое стекло) и культивировали в ростовой среде (среда DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 0,45% глюкозы, инсулина и гентамицина) в течение 16-18 суток в условиях 95%-ной влажности, при 36,7°C в атмосфере с 5% CO₂. Аутентичность культуры определялась по характерной микроскопической картине (наблюдавшейся с помощью микроскопа Leica DM LB HC с видеокамерой MPS60, "Wetzelar", Германия; компьютерная обработка изображений проводилась по программе Image Manager 5.0) и иммунофлуоресцентным анализом с использованием высокоспецифичных моноклональных антител к GFAP (рис. 2). Для иммунофлуоресцентного анализа культуру фиксировали раствором формальдегида с уксусной кислотой и этанолом, отмывали фосфатно-солевым буфером с твином-20, обрабатывали 0,5%-ным раствором бычьего сывороточного альбумина, повторно отмывали и инкубировали с моноклональными антителами к GFAP. Связавшиеся антитела выявляли по их реакции с ФИТЦ-мечеными козьими антителами к мышиным иммуноглобулинам. Связывание ПЭГилированных иммунолипосом, конъюгированных с теми же моноклональными антителами, определялось по появлению свечения, обусловленного липидным флуоресцентным индикатором Dil, введенным в состав липосомных мембран (с помощью того же микроскопа с применением фильтров с длиной волны возбуждения 515-560 нм). Специфичность этого связывания подтверждалась его ингибированием, наблюдаемым после преинкубации клеток с немечеными анти-GFAP-антителами. В качестве отрицательного контроля использовали липосомы, конъюгированные с неспецифическими мышиными иммуноглобулинами.

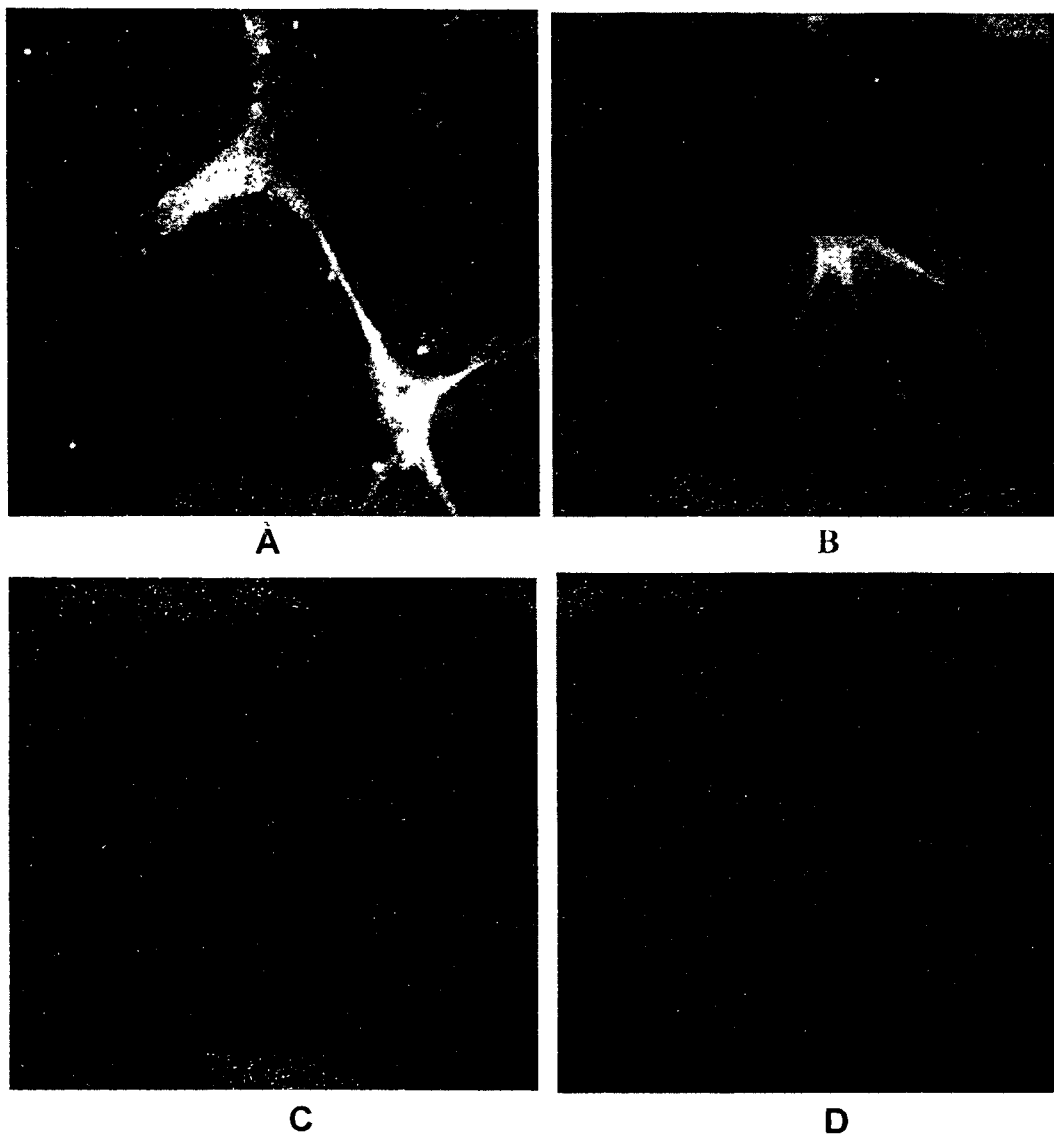


Рисунок 2.

Микрофотографии культуры эмбриональных астроцитов мозга крысы:

А — культура эмбриональных астроцитов крысы, обработанная последовательно моноклональными анти-GFAP-антителами (D4) и конъюгатом козьих антигел к иммуноглобулинам мыши, меченных ФИТЦ;

В и С — культура эмбриональных астроцитов крысы, инкубированная с ПЭГилированным препаратом иммунолипосом (с анти-GFAP-антительным вектором (D4)), меченных DiI в течение 3 и 9 часов, соответственно;

Д — культура эмбриональных астроцитов крысы, инкубированная с ПЭГилированным препаратом иммунолипосом (с анти-NSE-антительным вектором (5C4D12), неспецифичным для астроцитов), меченных DiI в течение 9 часов;

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Процедура приготовления липосомных препаратов, описанная выше и основанная на методике, предложенной нидерландской группой исследователей [11], в работе оказалась вполне адекватной. Таким способом были приготовлены ПЭГилированные

ПЭГИЛИРОВАННАЯ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ СИСТЕМА

иммунолипосомы, которые по своему составу и кинетическим характеристикам были весьма близки тем, которые описаны в работе [11]. Естественные различия заключались только в природе и специфичности векторных моноклональных антител, конъюгированных с липосомными контейнерами (в работе [11] это были антитела СС52 к клеткам крысиной аденокарциномы СС531, в нашем случае — антитела D4 к GFAP из ткани мозга человека), а также в содержимом этих контейнеров (в данном случае, модельного гептапептида Lys-Tyr-Lys-Pro-Lys-Tyr-Asp, ^{125}I -меченного по фенильным группам остатков тирозина).

На рисунке 3 приведена кривая кинетики системной элиминации ^{125}I из крови крыс после внутривенного введения трех форм, меченного ^{125}I пептида — свободного и заключенного в ПЭГилированные липосомы, конъюгированные или неконъюгированные с векторными антителами. Сравнение кинетических параметров, рассчитанных для этих препаратов, показывает существенные различия в скоростях элиминации свободного пептида и пептида, включенного в ПЭГилированные липосомы, типичные для кинетики таких липосом. В частности, при применении липосомального контейнера оказались значительно продленными как кинетическая фаза распределения ($T_{1/2}^{\text{расп}}$ увеличивается с 7,3 с до 33 с, т.е. в 4,5 раза), так и фаза элиминации ($T_{1/2}^{\text{эл}}$ = 3,6 и 14,7 ч соответственно). При этом такой важнейший интегральный параметр, характеризующий системное присутствие препарата, как площадь под фармакокинетической кривой “концентрация-время”, возрастал почти в 90 раз (978 у.е. против 11 у.е.). Точно так же, как и в работе [11], применение контейнерной липосомальной формы во много раз увеличивает продолжительность системной циркуляции транспортируемого агента — через сутки после внутривенного введения липосомального препарата пептида в венозной крови определялось от 20 до 30% его начального количества (в долях нормализованной C_0), тогда как для свободного пептида эта величина составляла лишь $0,130 \pm 0,006\%$. Аналогичные результаты были получены и для ПЭГилированных иммунолипосом, однако, присутствие конъюгированных антител существенно ускоряло как распределение (примерно в три раза по сравнению с неконъюгированными липосомами), так и элиминацию (в два раза).

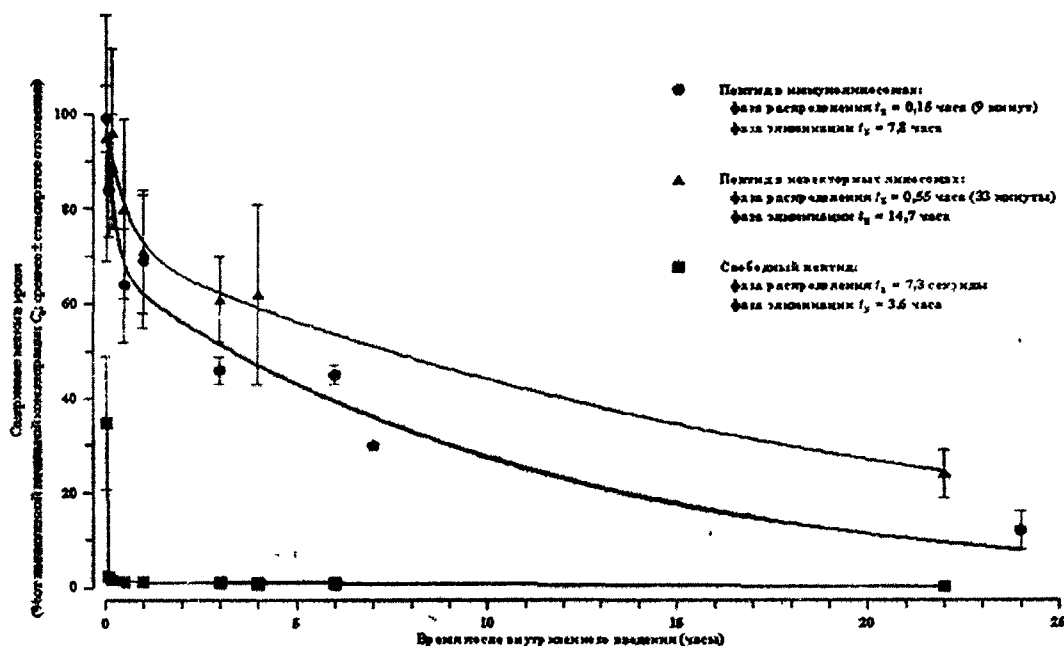


Рисунок 3.

Кинетика системной элиминации свободного ^{125}I -меченного гептапептида и того же пептида, заключенного в ПЭГилированные липосомы, после внутривенного введения крысам.

К сожалению, мы не имели возможности оценить размер получаемых липосом путем непосредственных измерений. Тем не менее, полученные нами данные позволяют достаточно адекватно оценить эту величину. В частности, проинтегрировав хроматографический профиль, представленный на рисунке 1, можно заключить, что в липосомы было включено около 20% от общего количества радиоактивной метки, содержащейся в растворе. Эта доля абсолютно совпадает с той долей объема раствора, которая должна приходиться на внутреннее пространство унिलамеллярных липосом при использованной их концентрации и при том их размере (около 70 нм), который формируется экструзией через поры применявшихся мембранных фильтров. Следовательно, этот результат может служить свидетельством того, что в полученном препарате содержались липосомы именно такого размера.

Анализ липидного и белкового состава приготовленных иммунолипосом показал, что в зависимости от исходного соотношения липидных и белковых компонентов были получены препараты, в которых на 1 мкмоль фосфолипидов приходилось от 150 до 600 мкг конъюгированных антител, что соответствует референсным данным по использованной процедуре приготовления иммунолипосом [18]. Теоретический расчет, проведенный исходя из сведений о том, что полученные липосомы являются униламеллярными везикулами с диаметром около 70 нм и что каждая из них состоит примерно из 100 000 липидных молекул, позволяет заключить, что при указанном соотношении фосфолипидов и белка в полученных препаратах на одну липосому приходилось от 60 до 240 молекул конъюгированных антител. Этот результат также соответствует типичным характеристикам подобных липосом.

Адекватность векторной функции приготовленных ПЭГилированных иммунолипосом была подтверждена в экспериментах по их связыванию с культивированными эмбриональными астроцитами из нервной ткани крыс (рисунок 2, B-D). В этих экспериментах использовали препарат ПЭГилированных иммунолипосом, меченных липидным флуоресцентным индикатором Dil, в которых на 1 мкмоль фосфолипида приходилось около 240 мкг конъюгированных моноклональных антител, специфичных к GFAP (т.е. примерно 90 молекул антител, конъюгированных с одной липосомой). В качестве контроля применяли меченные Dil, ПЭГилированные липосомальные контейнеры, конъюгированные с неспецифическими для астроцитов антителами к нейронспецифической енолазе (NSE). При этом количество молекул анти-NSE-антител, конъюгированных с одной липосомой, было сопоставимо с экспериментальным препаратом. Диапазон концентраций, использованных липосомных эмульсий варьировал от 0,2 до 1 мкмоль фосфолипидов в 1 мл инкубационной среды; продолжительность инкубации — 3-9 часов.

На рисунке 2 представлены результаты иммунофлуоресцентного анализа взаимодействия исследуемых препаратов ПЭГилированных иммунолипосом с эмбриональными астроцитами крысы. Как видно из рисунка, инкубация культуры эмбриональных астроцитов мозга крысы с ПЭГилированными липосомами, конъюгированными с моноклональными антиGFAP-антителами D4, приводила к появлению интенсивного красного свечения астроцитов, характерного для флуоресценции липидного индикатора Dil. Увеличение дозы или длительности инкубации не приводило к видимому усилению флуоресценции клеток. Следует подчеркнуть, что ни в одном из контрольных опытов подобное окрашивание астроцитов не наблюдалось (рисунок 2 D). Более того, преинкубация клеточной культуры со свободными нативными антителами D4 конкурентно элиминировала появление такой флуоресценции при последующем введении иммунолипосом, конъюгированных с теми же антителами, тогда как преинкубация клеток с неспецифическими антителами не влияла на последующее связывание флуоресцентной метки, введенной в состав специфических иммунолипосом.

Эти результаты можно рассматривать как доказательство того, что

ПЭГИЛИРОВАННАЯ ИММУНОЛИПОСОМАЛЬНАЯ СИСТЕМА

полученный препарат ПЭГилированных иммунолипосом сохраняет иммунокомпетентность конъюгированных антител и способен специфически связываться с глиофибрилярным кислым протеином, специфическим маркером астроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cerletti A., Drewe J., Fricker G., Eberle A.N., Huwyler J.* (2000) *J. Drug Targeting*, **8**, 435-446.
2. *Gutman R.L., Peacock G., Lu D.R.* (2000) *J. Controlled Release*, **65**, 31-41.
3. *Huwyler J., Wu D., Pardridge W.M.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14164-14169.
4. *Shi N., Boado R.J., Pardridge W.M.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14709-14714.
5. *Shi N., Pardridge W.M.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 7567-7572.
6. *Wu D., Pardridge W.M.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 254-259.
7. *Чехонин В.П., Дмитриева Т.Б., Журков Ю.А.* (2000) Иммунохимический анализ нейроспецифических антигенов. — М.: Медицина.
8. *Chekhonin V.P., Kabanov A.V., Zhirkov Yu.A., Morozov G.V.* (1991) *FEBS Letters*, **287**, 149-152.
9. *Chekhonin V.P., Ryabukhin I.A., Zhirkov Yu.A., Kashparov I.A., Dmitrieva T.B.* (1995) *Neuroreport*, **7**, 129-132.
10. *Чехонин В.П., Гурина О.И., Дмитриева Т.Б., Шенелева И.И., Рябухин И.А., Бабич Г.Н.* (2001) Бюлл. эксп. биол. мед., № 8, 188-191.
11. *Kamps J.A.A.M., Konig G.A., Velinova M.J., Morselt H.W.M., Wilkens M., Gorter A., Donga J., Scherphof G.L.* (2000) *J. Drug Targeting*, **8**, 235-245.
12. *Benzinger P., Martiny-Baron G., Reusch P., Siemeister G., Kley J.T., Marme D., Unger C., Massing U.* (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1466**, 71-78.
13. *Stewart J.C.M.* (1980) *Anal. Biochem.*, **104**, 10-14.
14. *Wessel D., Flügge U.I.* (1984) *Anal. Biochem.*, **138**, 141-143.
15. *Barnea A., Roberts J.* (1999) *Brain Res. Protocols*, **4**, 156-164.
16. *Froes M.M., Correia A.H.P., Garcia-Abreu J., Spray D.C., Campos de Carvalho A., Neto V.M.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7541-7546.
17. *Nakanishi K., Nakanishi M., Kukita F.* (1999) *Brain Res. Protocols*, **4**, 105-114.
18. *Lasic D., Marin F.* (Eds.) (1995) *Stealth liposomes*, Boca Raton: CRS Press.

Поступила: 01.02.2003 г.

**PEGYLATED IMMUNOLIPOSOMES DIRECTED AGAINST EMBRYONAL RAT
BRAIN ASTROCYTES**

*V. P. Chekhonin, Yu. A. Zhirkov, O. I. Gurina, S. V. Lebedev, T. B. Dmitriyeva, A. V. Semenova,
N. V. Jaglova, A. E. Rjabinina*

Laboratory of Immunochemistry, Serbsky National Research Center for Social and Forensic
Psychiatry, Kropotkinsky per. 23, Moscow, 119839 Russia
tel.: 007 095 202-28-13. fax: 007 095 201-50-55. e-mail: chekhonin@aport.ru

PEGylated (stealth) immunoliposomes covalently linked to antibodies against human gliofibrillary acidic protein (GFAP) were prepared by coupling the thiolated monoclonal anti-GFAP antibodies, D4, with a maleimide derivative of the phosphatidyl ethanolamine of the liposomal membrane. Depending on the initial protein-to-lipid ratios, the immunoliposomes prepared (with a diameter of about 70 nm) were coupled with 60 to 240 molecules of the antibodies. In vitro experiments with cultures of the embryonic rat brain astrocytes demonstrated a specific binding of these immunoliposomes, which could be inhibited by the preincubation of the cells with free non-coupled D4 but not with non-specific antibodies. Administered intravenously into rats, the immunoliposomes exhibited a kinetic behaviour typical for the PEGylated liposomes: after 24 h, approximately 20% of the doses injected were still present in the blood; the elimination rate constants were 0.05-0.09 h⁻¹, the elimination half-lives were 8-15 h. With such a systemic longevity, as well as with such a specificity, these immunoliposomes, non-penetrating through intact blood-brain barrier (BBB), should be useful in delivering pharmacological agents to glial brain tumours (which continue to express GFAP) or to other pathological loci in the brain with a partially disintegrated BBB.

Key words: Immunoliposomes, liposomes, GFAP, astrocytes