БІОМЕДИЦИНА

Отримання та властивості фотоактивного імунокон'югату гематопорфірину з антитілами до фактора росту ендотеліальних клітин

І. О. Лісняк, Н. Л. Новиченко, А. А. Мамчур, М. Ф. Гамалія

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України
Вул. Васильківська, 45, Київ, Україна, 03022

gamaleia@onconet.kiev.ua

Описано метод отримання фотоімунокон'югатів на основі гематопорфірину та антитіл, специфічних до фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF). Одержаний кон'югат зберігає фізико-хімічні та біологічні властивості як білкового компонента кон'югату, так і порфіринової складової – гематопорфірину. Показано, что накопичення фотоімунокон'югату з антитілами до VEGF у мембранах курячих ембріонів виявилося в 2,5 разу вищим у період неоваскуляризації, яка розвивається, порівняно з періодом стабілізації.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, ангіогенез, кон'югати, гематопорфірин, VEGF.

Вступ. Останніми роками до онкологічної практики увійшов малотравматичний метод лікування злоякісних новоутворень – фотодинамічна терапія (ФДТ), який полягає у введені в організм з пухлиною фотосенсибілізаторів, здатних накопичуватися в злоякісних клітинах, робити їх світлочутливими, зумовлюючи тим самим вибіркове руйнування малігнізованих клітин при наступному опроміненні. Запропонований спосіб терапії дозволяє досягти значно більшої вибірковості пошкодження пухлин порівняно з радіо- та хіміотерапією. Селективність пошкодження пухлин при цьому пояснюється, перш за все, тим, що фотосенсибілізатор більше накопичується та довше затримується в пухлині у порівнянні з нормальними тканинами. Між тим це не забезпечує високого відсотку селективності нагромадження фотосенсибілізувальних агентів пухлинними тканинами, адже значною мірою акумуляція цих сполук спостерігається і в нормальних тканинах. Відсутність власне високоефективної селективності в накопиченні фотосенсибілізаторів пухлинами спонукала дослідників до пошуку нових підходів у ФДТ, які б забезпечували якщо не селективне нагромадження пухлинами фотосенсибілізувальних агентів, то хоча б їхнє ефективне «досилання» до пухлинних тканин.

Поштовхом до розробок подібних підходів стала робота 1980 р. [1]. Авторами дослідження показано, що гематопорфірин у вигляді кон'югату із специфічними до поверхневих антигенів пухлинних клітин антитілами накопичується в пухлинах значно більше порівняно з вихідним фотосенсибілізатором. Зазначене повідомлення відкрило шлях власне до розвитку так званої таргетної (цілеспрямованої) ФДТ терапії, де провідниками відповідних мішеней можуть слугували не лише антитіла [2–7], але й цитокіни [8], фактори росту, їхні рецептори тощо [9–13].

© Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 2009

У цьому ж напрямку останніми роками активно проводять дослідження, спрямовані на вивчення антиваскулярних ефектів фотодинамічної терапії [14], які сконцентровані не лише на пошуках нових класів фотосенсибілізувальних агентів, де мішенями виступала б васкулярна система пухлини, але й на розробці методів цілеспрямованої доставки фотосенсибілізаторів до судин, що активно формуються саме в пухлині. Одним із перспективних способів цілеспрямованої доставки до пухлинних судин, що активно формуються, є спрямоване селективне «досилання» фотосенсибілізувальних агентів у вигляді кон'югатів з факторами – індукторами ангіогенезу та антитілами до них.

Матеріали і методи. Поліклональні антитіла, специфічні до фактора росту ендотеліальних клітин (VEGF), отримували імунізацією кролів, проведеною за методом, в основу якого покладено індукцію локальної імунної реакції лімфатичних вузлів малою дозою антигену з використанням ад'юванту Фрейнда [15].

Як антиген для отримання антитіл використано мишачий ангіогенний фактор, отриманий за схемою, описаною в роботі [16]. Порфіриновою сполукою при одержанні кон'югату слугував гематопорфірин-дигідрохлорид («Sigma», США). Кон'югати синтезували за допомогою лінкера карбодіїмід–HCl.

Процедуру отримання кон'югованих з антитілами вказаних порфіринових сполук проводили за такою схемою [1]: 20 мг гематопорфірину розчиняли в 3 мл розчинника (вода:диметилформамід, 2,5:0,5). До розчину порфіринової сполуки додавали 20 мг 1-етил-3-(3-диметиламінпропіл)-диметилкарбодіїмід-HCl («Sigma»), розчиненого в 0,5 мл води. Змішані розчини гематопорфірину та лінкера витримували при кімнатній температурі протягом 30 хв. Після реакції до активного комплексу гематопорфірин–лінкер додавали 900 мг антитіл, розчинених у 5 мл забуференого фосфатного розчину, pH 7,2 (PBS), і залишали цю суміш на 5 год, періодично її перемішуючи. Під час цієї процедури pH підтримували в діапазоні 6–7. Наприкінці терміну інкубації (через 5 год) до реакційної суміші додавали 50 мкл моноетаноламіну для зупинки реакції. Надалі суміш залишали на 12 год за кімнатної температури.

Отриману суміш діалізували проти розчинника вода:диметилсульфоксид (2,5:0,5) протягом 72 год, періодично замінюючи діалізний розчин. Після діалізу отриманий кон'югат ліофілізували. Спектри поглинання сполуки записували на спектрофотометрі «Nano Drop» (США).

Фототоксичність імунокон'югату визначали в моделі фотоіндукованого гемолізу еритроцитів за активністю гематопорфірину в сполуці [1]. Кров здорових мишей тричі відмивали фізіологічним розчином і PBS у співвідношенні 1:5. Після процедури відмивання еритроцити осаджували центрифугуванням при 500 *g* упродовж 5 хв. Осад еритроцитів розводили PBS у співвідношенні 1:20 (за об'ємом). У пробірки вносили по 200 мкл розведеної суспензії еритроцитів та по 150 мкл PBS. В дослідні пробірки додавали по 50 мкл досліджуваного кон'югату. Контрольні проби містили по 50 мкл розчину вихідного гематопорфірину (20 мг гематопорфірину розчиняли в 3 мл розчинника вода:диметилформамід, 2,5:0,5). Для визначення темнової токсичності фотосенсибілізатора частину дослідних і контрольних зразків витримували в темряві. Дослідні ж проби опромінювали звичайним освітлювачем з інтенсивністю світлового потоку до 1,5 мВт/см^2 протягом 5 хв з періодичним перемішуванням. Після опромінення зразки центрифугували при 500 *g* упродовж 5 хв**.** В окремі пробірки вносили по 100 мкл супернатанту та додавали по 900 мкл реактиву Дробкіна (тест-система для кількісного визначення гемоглобіну) і спектрофотометрично при 540 нм визначали кількість гемоглобіну, який вивільнявся в результаті руйнації еритроцитів гематопорфірином після опромінення за калібровочною кривою, побудованою згідно з інструкцією для тест-системи.

Специфічну активність анти-VEGF антитіл у їхніх кон'югатах з порфіриновими сполуками, яка є однією з головних характеристик отриманих сполук, оцінювали, використовуючи метод імуноферментного аналізу (ELISA-тест), де VEGF слугував антигеном [15]. Антиген адсорбували в лунках планшет у дозі 10 нг на одну лунку.

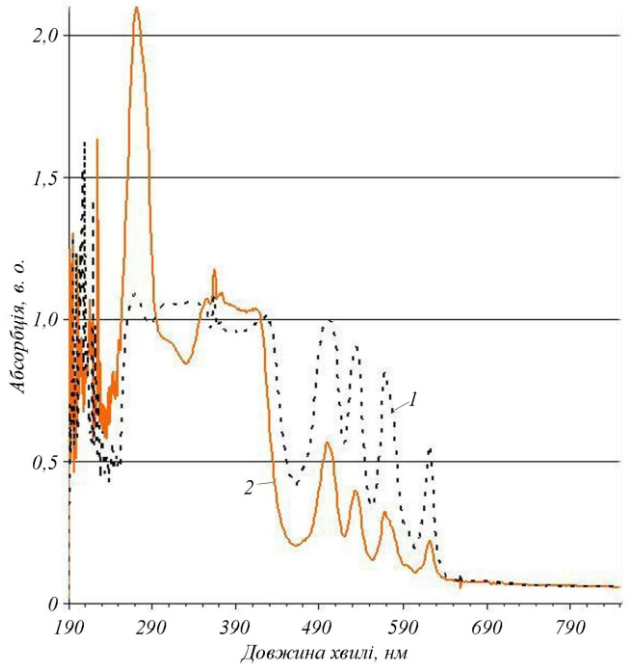

Рис. 1. Спектри абсорбції гематопорфірину (*1*) та його кон'югату з антитілом доVEGF (*2*)

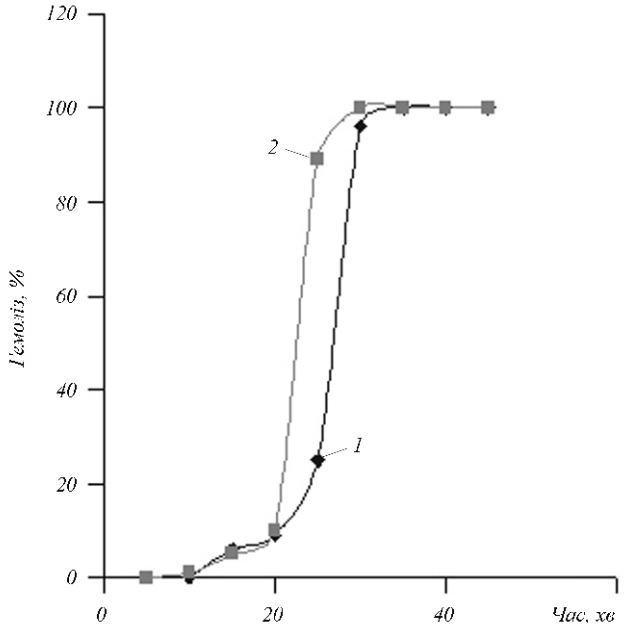

Рис. 2. Гемолітична активність кон'югованого з антитілами до VEGF гематопорфірину (*1*) та вихідного гематопорфірину (*2*), визначена в реакції фотоіндукованого гемолізу еритроцитів

Рівень накопичення кон'югатів у зонах неоангіогенезу аналізували на хоріон-алантоїсних мембранах курячих ембріонів. Фотосенсибілізатори (2 мг/кг в 0,2 мл) вводили в алантоїс ембріонів на 6-й і 10-й дні розвитку [17]. Через 24 год після введення фотосенсибілізаторів – гематопорфірину (контрольна група) та його кон'югату з антитілами до VEGF (дослідна група) – хоріон-алантоїсні мембрани видаляли, гомогенізували в 0,1 N NaOH (3 мл/0,5 г тканини) та центрифугували при 15000 *g* упродовж 20 хв. У відібраних супернатантах визначали вміст фотосенсибілізувального агента – гематопорфірину спектрофотометрично при 505 нм .

Результати і обговорення. Отримані спектри поглинання дослідженого кон'югату свідчать про відсутність суттєвих змін у поглинанні його порфіринової та білкової складових порівняно зі спектром поглинання мінорного компонента – гематопорфірину (рис. 1). Відомо, що при поглинанні порфіринових сполук у діапазоні 390–600 нм з максимумом при 505 нм характерною є присутність чотирьох складових спектра, серед яких найхарактернішою є наявність лінії Cape (пік поглинання при 410 нм). У спектрі поглинання кон'югованої сполуки в діапазоні 390–600 нм зберігаються ті ж піки абсорбції, серед яких присутня і лінія Cape. Порівняння зазначених спектрів вихідного гематопорфірину та фотосенсибілізатора, кон'югованого з антитілами, вказує на відсутність суттєвих змін у фізичних властивостях порфіринової компоненти кон'югату. Вірогідно, не зазнав суттєвих фізичних змін і білковий компонент кон'югованої сполуки – антитіла.

В розгорнутому спектрі поглинання (190–690 нм) спостерігаємо незмінний пік абсорбції при 260 нм, характерний саме для білків. Отже, кон'югована сполука фотосенсибілізатора гематопорфірину та поліклональних антитіл до фактора росту ендотеліальних клітин практично не втратила абсорбційних властивостей, притаманних окремо як білковій компоненті – (антитілам), так і порфіриновій складовій (гематопорфірину).

Молярне співвідношення гематопорфірину та антитіл у кон'югаті, визначене за поглинанням при 505 та 280 нм відповідно, становить 4,2.

При дослідженні фототоксичності отриманого імунокон'югату з'ясувалося, що дія на еритроцити (реакція гемолізу) еквівалентних концентрацій

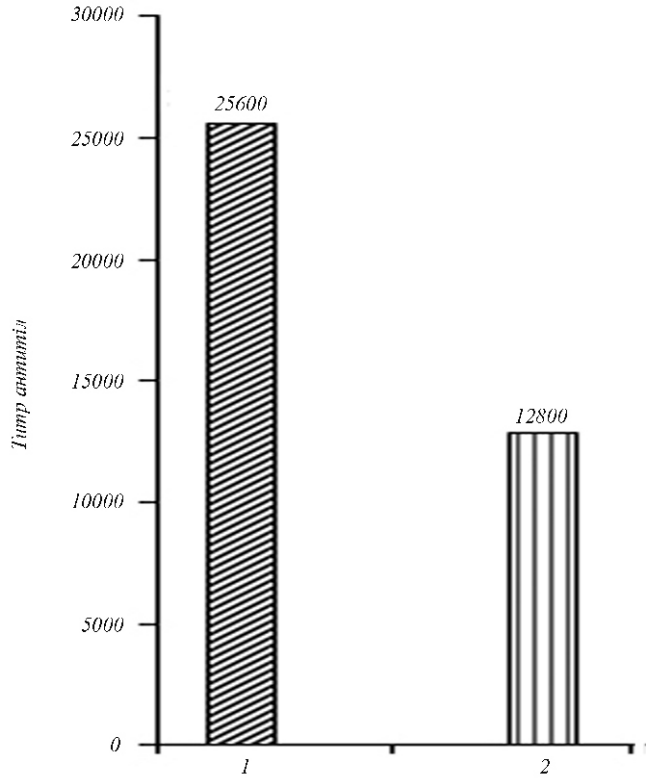

Рис. 3. Титр антитіл проти VEGF у реакції антиген–антитіло в імуноферментному тесті (ELISA): *1* – некон'юговані антитіла; *2* – антитіла, кон'юговані з гематопорфірином

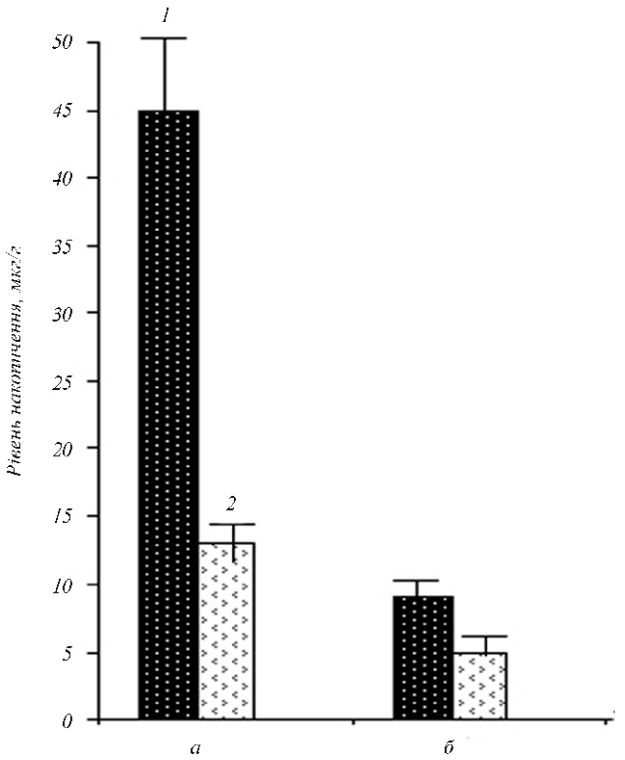

Рис. 4. Накопичення кон'югованого з антитілами до VEGF гематопорфірину (*а*) та вихідного гематопорфірину (*б*) в хоріон-алантоїсних мембранах курячих ембріонів 6-го (*1*) та 10-го (*2*) днів розвитку

кон'югату і вихідного фотосенсибілізатора – гематопорфірину – є рівноактивною (рис. 2). Між тим варто відмітити відсутність реакції гемолізу в пробах, які витримували в темряві. Останнє вказує на те, що одержаному кон'югату не властива темнова фототоксичність.

Специфічна активність антитіл у кон'югатах з порфіриновими сполуками є однією з головних характеристик подібних сполук. В результаті проведених досліджень виявилося, що реакція утворення кон'югату гематопорфірину з антитілами до VEGF за допомогою лінкера карбодіїміду суттєво впливає на специфічну активність антитіл у кон'югатах. Титр цих антитіл у реакції антиген–антитіло в імуноферментному тесті (ELISA) становить 12800, що все ж таки нижче у два рази порівняно з титром некон'югованих антитіл (25600) (рис. 3).

Вивчення специфічного накопичення кон'югатів у зонах неоангіогенезу курячих ембріонів показало суттєву різницю в акумулюванні фотоактивної сполуки васкулярною системою хоріон-алантоїсних мембран ембріонів 6-го та 10-го днів розвитку (рис. 4).

Відомо, що хоріон-алантоїсним мембранам 6-го дня розвитку ембріонів притаманна максимальна проліферація ендотелію та капіляроутворення. Між тим, на 10-й день розвитку спостерігається стабілізація неоваскулярних процесів у мембранах. В результаті проведених досліджень встановлено, що через 24 год після введення кон'югату хоріон-алантоїсні мембрани відзначаються різним ступенем накопичення фотосенсибілізатора. Так, на 6-й день розвитку ембріонів (період максимальної проліферації ендотелію та капіляроутворення) порівняно з мембранами ембріонів 10-го дня розвитку накопичується в 2,5 разу більше гематопорфірину, кон'югованого з антитілами до VEGF. Оскільки для цього періоду характерна стабілізація неоваскулярних процесів, такі результати вказують на явну судинотропність у нагро-

мадженні сенсибілізатора саме завдяки цілеспрямованому його «досиланню» безпосередньо в зони активного ангіогенезу, якими в експерименті слугували хоріон-алантоїсні мембрани курячих ембріонів саме 6-го дня розвитку.

Як відомо, ФДТ полягає у введенні в організм з пухлиною фотосенсибілізаторів, які б селективно накопичувалися у злоякісних клітинах. Однак відомі на сьогодні фотосенсибілізатори, що використовують в онкології, подібної селективності не мають. Реальним засобом наділити їх такою «селективністю» є створення на основі фотоактивних сполук кон'югатів з біологічно активними речовинами, здатними проводити ефективне цілеспрямоване «досилання» фотосенсибілізувальних агентів до пухлин. Ефективною мішенню для цілеспрямованого «досилання» фотоактивних сполук може бути васкулярна система пухлин.

У дослідженнях, проведених на хоріон-алантоїсних мембранах курячих ембріонів, виявлено, що отриманий нами фотоактивний кон'югат гематопорфірину з антитілами до VEGF проявляє здатність до значного накопичення саме в зонах активного розвитку капілярної мережі мембран ембріонів. За стабілізації неоангіогенезу (10-й день розвитку ембріонів) акумуляція фотоактивного кон'югату мембранами різко знижується. Виходячи з вищевикладеного можна стверджувати, що отриманий нами кон'югований фотосенсибілізатор має судинотропні властивості. Останнє обумовлює розробку на його основі методу, використання якого дозволить спрямувати фотодинамічну дію на новоутворені судини пухлин через ангіогенно активовані ендотеліальні клітини, що безпосередньо беруть участь у формуванні зон неоваскуляризації при розвитку пухлини, подальшому її рості та метастазуванні.

Преферентність ендотеліальних клітин як мішеней для впливу на пухлину визначається експресією на їхній поверхні рецепторів до цитокінів ангіогенезу, зокрема, фактора росту ендотеліальних клітин.

Застосування такого варіанта цілеспрямованої ФДТ здатне підвищити фотодинамічний протипухлинний ефект при зниженні доз введених фотосенсибілізаторів та знизити рівень їхньої токсичності.

Висновки. 1. Отримано фотоактивний біокон'югат антитіл до VEGF з фотосенсибілізатором – гематопорфірином.

2. Зазначений кон'югат практично не втрачає фізичних та біологічних властивостей, притаманних окремо як білковій компоненті кон'югату – антитілам, так і його порфіриновій складовій – гематопорфірину.

3. Виявлено, що в хоріон-алантоїсних мембранах курячих ембріонів з максимальною проліферацією ендотелію (на 6-й день розвитку ембріонів) накопичується кон'югату в 2,5 разу більше порівняно з мембранами ембріонів 10-го дня розвитку (період стабілізації неоваскулярних процесів).

I. O. Lisniak, N. L. Novichenko, A. A. Mamchur, M. F. Gamaliya

Photoactive immunoconjugate of hematoporphyrin with antibodies to vascular endothelial growth factor: preparation, physicochemical and biological properties

Summary

Preparation of photoimmunoconjugates on the basis of hematoporphyrin and antibodies to the vascular endothelial growth factor (VEGF) is described. The obtained conjugate preserved physicochemical and biological properties of both protein component and porphyrin part – hematoporphyrin. It was shown that accumulation of the photoimmunoconjugate with VEGF antibodies in chicken embryo membranes was 2,5 times larger at the period of the neovascularization than at the stabilization.

Keywords: photodynamic therapy, angiogenesis, conjugates, hematoporphyrin, VEGF.

И. А. Лисняк, Н. Л. Новиченко, А. А. Мамчур, Н. Ф. Гамалея

Получение и свойства фотоактивного иммуноконъюгата гематопорфирина с антителами к фактору роста эндотелиальных клеток

Резюме

Описан метод получения фотоиммуноконъюгатов на основе гематопорфирина и антител, специфичных к фактору роста эндотелиальных клеток (VEGF). Полученный конъюгат сохраняет физико-химические и биологические свойства как белкового компонента конъюгата, так и порфириновой составляющей – гематопорфирина. Показано, что накопление фотоиммуноконъюгата с антителами к VEGF в мембранах куриных эмбрионов было в 2,5 раза выше в период развивающейся неоваскуляризации по сравнению с периодом стабилизации.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, ангиогенез, конъюгати, гематопорфирин, VEGF.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Mew D., Wat C. K., Towers G. H., Levy J. C.* Photoimmunotherapy treatment of animal tumors with tumo-specific

monoclonal antibody – hematoporphyrin conjugates // J. Jmmunol.–1983.–**130**, N 3.–P. 1473–1477.

2. *Jiang F. N., Richter A. M., Jain A. K., Levy J. G., Smith C.* Biodistribution of a benzoporphyrin derivative-monoclonal antibody conjugate in A 549 – tumor-bearing nude mice // Biotechnol. Ther.–1993.–**4**, N 1–2.–P. 43–61.
3. *Carcenac M., Larrogue C., Langlois R., van Lier J., Artus J., Pelegrin A.* Preparation, phototoxicity and biodistribution studies of anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody – phthalocyanine conjugates // J. Photochem. Photobiol.–1999.–**70**, N 6.–P. 930-936.
4. *Vrouenraets M. B., Visser G. W., Stigter M., Oppelaar H., Snow G. B, van Dongen G. A.* Comparison of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate- and meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for their efficacy in photodynamic therapy *in vitro* // Int. J. Cancer.–2002.–**98**, N 5.–P. 793–798.
5. *Fabbrini M., Trachsel E., Soldani P., Bindi S., Alessi P., Bracci L., Kosmehl H., Zardi L., Neri D., Neri P.* Selective occlusion of tumor blood vessels by targeted delivery of an antibody-photosensitizer conjugate // Int. J. Cancer.–2006.–**118**, N 7.–P. 1805–1813.
6. *Sharman W. M., van Lier J. E., Allen C. M.* Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems // Adv. Drug Deliv. Rev.–2004.–**56**, N 1.–P. 53–76.
7. *Governatore M., Hamblin M. R., Shea C. R., Rizvi I., Molpus K. G., Tanabe K. K., Hasan T.* Experimental photoimmunotherapy of hepatic metastases of colorectal cancer with a 17.1 A chlorin e6 immunoconjugate // Cancer Res.–2000.–**60**.–P. 4200–4205.
8. *Linares R., RachecoY. R., Good T. A.* Efficacy of different targeting agents in the photolysis of interleukine-2 receptor bearing cells // J. Photochem. Photobiol.–2004.–**77**, N 1–3.–P. 17–26.
9. *Giysene A., Missiaen L., Wilfried M., Witte P.* Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorine e6 selectively potentiates its photodynamic activity // Cancer Res.–2000.–**60**, N 8.–P. 2197–2202.
10. *Savellano M., Pogue B., Hoopes P., Vitetta E., Paulsen K.* Multiepitope HER2 targeting enhances photoimmunotherapy of HER2-overexpessing cancer cells with pyropheophorbide – immunoconjigates // Cancer Res.–2005.–**65**, N 14.–P. 6371–6379.
11. *Soukos N., Hamblin M., Keel S., Fabian R., Deutsch T., Hasan T.* Epidermal growth factor receptor-targeting immunophotodiagnosis and photoimmunotheraphy of oral precancer *in vivo* // Cancer Res.–2001.–**61**, N 11.–P. 4490–4496.
12. *Gijsens A., De Witte P.* Targeting of chlorine E6 by EGF increasing its photodynamic activity in selective ways // Verth. K Acad. Geneeskd. Belg.–2000.–**62**, N 4.–P. 329–352.
13. *Gupta S., Mishra A. K., Muralidhar K., Jain V.* Improved targeting of photosensitizers by intratumoral administration of immunoconjugates // Technol. Cancer Res. Treat.–2004.–**3**, N 3.–P. 295–301.
14. *Chen B., Pogue B. W., Luna J. M., Hardman R. L., Hoopes P. J., Hasan T.* Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications // Clin. Cancer Res.–2006.–**12**, N 3.–P. 917–923.
15. *Иммунологические* методы / Под ред. Г. Фриммеля.–М.: Медицина, 1987.–518 с.
16. *Лісняк І. О.* Неоваскуляризація і пухлинний ріст: Автореф. дис. д-ра біол. наук.–Київ, 2004.–38 с.
17. *Roberts W., Hasan T.* Role of neovascularization and vascular permeability on the tumor retention of photodynamic agents // Cancer Res.–1992.–**52**, N 4.–P. 924–930.

УДК 616-006.04:615.37:577.112.85
Надійшла до редакції 04.02.08