



УДК 543.544.5.068.7

Изучение комплексообразования и устойчивости в реакциях интерлигандного обмена сополимеров класса N-виниламидов с галлием и индием методом жидкостной хроматографии

Горшков Н.И., Мурко А.Ю., Красиков В.Д.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук (ИВС РАН), Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 30.11.2015 г.

Методами монолитной и эксклюзионной жидкостной хроматографии изучены реакции комплексообразования сополимера винилпирролидона (ВП) с винилформаимидом (ВФА) с привитым бифункциональным хелатным узлом иминодиуксусной кислоты (ИДУК) с трехвалентными металлами (галлий, индий) при различных pH. Показана более высокая реакционная способность индия по сравнению с галлием. Изучена стабильность металло-полимерных комплексов (МПК) в реакциях с гистидином. Продемонстрировано, что Ga-МПК остается стабильным, в то время как In-МПК подвергается практически полной деструкции.

Ключевые слова: ВЭЖХ, СИМ технология, радиофармпрепараты, радионуклиды, сополимеры, хелатный узел

Study of complexation and stability in inter ligand exchange reactions of N-vinylamide co-polymers with gallium and indium by liquid chromatography.

Gorshkov N.I., Murko A.Yu., Krasikov V.D.

Institute of macromolecular compounds of the Russian Academy of Science (IMC RAS), St.-Petersburg

At present time nuclear medicine is rapidly developing field of medicine which allows to obtain high-resolution quantitative data on the pathologies of the living organism and to monitor physiological and biochemical. The goal of this work is to develop methods of study of the complexation of biologically active copolymer systems with ions of trivalent metals (indium, gallium) by liquid chromatography for development of novel macromolecular radiopharmaceuticals. Liquid chromatography is essentially the single method of determining of radiochemical yield and purity of the radiopharmaceuticals, and tool for isolation and purification of preparation.

HPLC was used in two modifications: a monolithic chromatography on ultra short monolith columns for evaluation of kinetics of complex formation and the traditional size-exclusion chromatography mode for determination of molecular weight characteristics of the metal-polymer complexes (MPC) and for study histidine challenge reaction. It was shown that the complex formation with chelation units (iminodiacetic acid) of copolymer of vinylpyrrolidone and vinyl formamide with a gallium is more reactive than that of indium. The obtained MPC are stable at physiological pH for long time. Reaction of Ga-MPC with histidine appeared to be fairly stable in contrast to In-MPC analogue, which was completely decomposed in the same conditions.

Keywords: HPLC, CIM technology, radiopharmaceuticals, radionuclides, co-polymers, chelation unit

Введение

Одним из приоритетных направлений развития неинвазивных методов исследования и терапии различных заболеваний и дисфункций организма является ядерная медицина. В основе метода лежит использование радиофармпрепаратов (РФП) – биологически активных соединений, меченных радиоактивными изотопами с различными типами распада и энергетическими характеристиками. Этот метод позволяет получать с высоким разрешением количественные данные о патологиях организма и о физиологических и биохимических процессах, протекающих в нем. В современной медицинской практике широкое применение нашли изотопы трехвалентных металлов -галлий-68, индий-111, иттрий-90, позволяющие проводить как диагностические исследования, так и проводить терапию злокачественных заболеваний [1].

Синтетические биологически активные полимеры (БАСП) (например, сополимеры N-винилпирролидона) перспективны с точки зрения ядерной медицины, поскольку приняты в клинической практике в качестве носителей низкомолекулярных биологически активных веществ (БАВ) [2, 3].

Сравнительно недавно в литературе появились данные о введении радиоактивных металлов в состав полимеров-носителей с целью создания новых макромолекулярных РФП для диагностики и терапии опухолей [4-5]. При выделении и очистке РФП, определении их радиохимической чистоты (РХЧ) и радиохимического выхода (РХВ) основным методом является жидкостная хроматография, которая по сути является также и единственным способом контроля качества.

Предварительная отработка методов анализа и выделения РФП проводится на «холодных» аналогах. В случае макромолекул (антитела, тяжелые белки) в качестве основного инструмента используют в основном эксклюзионную хроматографию. В то же время для задач разделения синтетических биополимеров весьма эффективными могут явиться монолитные ультракороткие колонки (СІМ, Convective Interaction Media), позволяющие эффективно разделять как собственно крупные природные молекулы, так и проводить их отделение от низкомолекулярных компонент [5-7].

В работе поставлена задача изучения комплексообразования сополимера ВП-ВА-ИДУК с ионами «холодных» трехвалентных металлов (галлий, индий – аналогов радиоактивных галлия-68 и индия-111) методами жидкостной хроматографии с целью экстраполяции отработанных подходов для реального радиохимического синтеза, а также установления стабильности полученных МПК в реакции интерлигандного обмена с мощным хелатором и биологически важной аминокислотой – гистидином (histidine challenge reaction (HCR)).

Эксперимент

Водорастворимый сополимер получали путём введения в состав сополимеров N-ВП и N-виниламина (ВА) остатков иминодиуксусной кислоты (ИДУК) с получением ВП-АА-ИДУК по методике [7]. Молекулярные массы (ММ) и молекулярно-массовые характеристики (ММХ) были определены методами вискозиметрии и высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием констант Марка-Куна- Хаувинка (М-К-Х) для ПВП [8]. Для эксклюзионной хроматографии использовали хроматографические колонки

Ultrahydrogel Linear 0,78x30см (элюент – 0.2 М NaCl). Калибровку хроматографических колонок проводили по поливинилформамидным (ПВФА) стандартам с различной ММ. Средневязкостные η были определены в 0,1М растворе ацетата натрия при 25⁰С на вискозиметре Убеллоде. Анализ полученных металл-полимерных конъюгатов проводили на ультракоротких колонках CIM VIA SeparationsTM (Austria) (12x4 мм) в градиентном режиме.

Реакции сополимера ВП-ВФА-ИДУК с галлием и индием проводили в водных растворах в диапазоне рН 1-5 во избежание гидролиза ионов металла при комнатной температуре в случае галлия и при нагревании до 70-80⁰С для индия при соотношении металл-(ИДУК)полимера 1:1. За ходом реакции наблюдали методом ВЭЖХ на ультра коротких CIM колонках.

НСР проводили добавлением 10 кратного избытка гистидина в реакционную смесь при комнатной температуре и экспозицией реакционной смеси в течение 10 – 60 мин.

Обсуждение результатов

Разделение полимеров по гидродинамическим размерам молекулы пропорционально произведению логарифма молекулярной массы и характеристической вязкости $[\eta]=KM^a$, где К – константа, зависящая от системы полимер-растворитель, а – константа, зависящая от гибкости цепи и асимметрии макромолекулы в растворе, широко принята в традиционной эксклюзионной хроматографии. Это справедливо для полимеров одного ряда с одинаковыми структурными и гидродинамическими характеристиками и выражающейся в концепции универсальной калибровочной зависимости Бенуа [9]. Поведение гибкоцепных БАСП в водных растворах сильно зависит от полиэлектролитных эффектов, которые существенным образом влияют на их конформационное поведение и гидродинамические размеры, как функции молекулярной массы [10]. Особенно эти эффекты проявляются при включении при в состав сополимера металла, связанного хелатным узлом со своим зарядом и стерикой. Привитые к полимерной цепи хелатные узлы могут быть либо доступны для координации металла (в случае набухания полимера), либо заблокированы (в случае «коллапсирования» структуры). Применение эксклюзионной хроматографии для разделения исходного сополимера, иона металла и металл-конъюгата в особенности в водных растворах является неоднозначной задачей. Сложное гидролитическое поведение ионов металлов в водных растворах как правило приводит к их необратимой сорбции на материале колонки.

Напротив, при применении нормально-фазных и обратно-фазных сорбентов возможно хорошее разделение ионов металлов, но это зачастую приводит к сорбции синтетических полиэлектролитов.

Для решения комплексной задачи разделения гибкоцепных БАСП и ионов радиоактивных металлов представляется возможным применение монолитных сорбентов, на которых возможно разделение как макромолекул, гомополимеров в градиентном режиме [11], так и ионов металлов [12].

Ранее [14] нами было установлено, что достигнуть разделения по молекулярным массам для различных гибкоцепных сополимеров на ультракоротких колонках в водных растворах в «хороших», θ -растворителях, невозможно. БАСП элюируются практически с мертвым объемом колонки с временем удерживания (RT)

0.9-1.3 мин. Переход от гидрофобного сорбента GMA-EDMA к ионообменникам, привитых на поверхности монолита (DEAE, QA, CM, SO₃), также не влияет на RT.

Нами был выбран сополимер с молекулярной массой (ММ) 50 кДа (по данным молекулярной гидродинамики и оптики и эксклюзионной хроматографии) при содержании формамидных групп 7 мол.%, и ИДУК - 3 моль.% (потенциометрическое титрование). Такой состав был обусловлен, с одной стороны, относительно невысоким содержанием БФХ, что не должно приводить к нарушению гидродинамических свойств макромолекулы, а с другой, такой ММ, которая обуславливает возможность реализацией EPR (enhanced permeation and retention) эффекта [15], обеспечивающий удерживание макромолекулы в пораженной клетке.

В качестве бифункционального хелатора (БФХ) для связывания модельного «холодных» металлов был выбран остаток иминодиуксусной кислоты (ИДУК), связанного с полимерной цепью (рис.1).

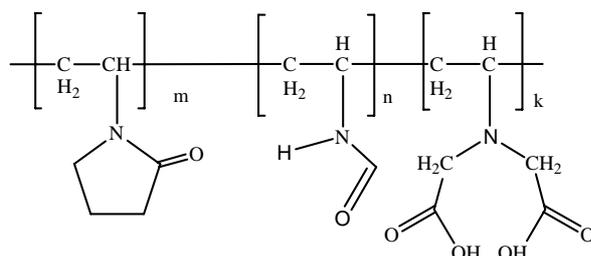


Рис. 1. Структура сополимера винилпирролидона с винилформамидом и иминодиуксусной кислотой (ВП-ВФА-ИДУК)

Известно, что тридентатный лиганд ИДУК образует прочные комплексы с ионами большинства металлов. Однако, поскольку ионы трехвалентных металлов в водных растворах реализует координационное число 6, оставшиеся три координационные вакансии могут быть заняты лабильными лигандами (вода), или при высоких значениях pH (>>8) гидролизуются с образованием сложных ассоциатов. Далее такие не полностью «закрытые» системы в биологически активных средах приводят к связыванию иона металла с белками крови (трансферрином) и нарушению целевого транспорта макромолекулы. В данной работе мы исходили из предположения, что микроблочная гибкоцепная структура сополимера ВП-ВА-ИДУК (N-винилпирролидон-винил-N-виниламин-ИДУК)¹⁸ позволит замкнуть полимерную цепь с образованием сшивающих фрагментов состава M(ИДУК)₂ в составе сополимера.

Синтез МПК осуществлялся при значениях pH 1-5, т. е. в условиях, при которых ионы металлов существует в гексаакватированной или моногидроксо форме и не образует нереакционноспособной нерастворимой гидроокиси.

Реакция протекала при комнатной температуре в течение 15-20 мин в случае галлия и требовала нагрева до 70-80°C в случае индия. Такая разница в реакционной способности связана, вероятно, с большим ионным радиусом последнего. Контроль за ходом реакции осуществляли методом ВЭЖХ на ультракоротких монолитных колонках СИМ (Convective Interaction Media) с использованием сильного катионообменника QA (quarterly ammonium). Применение подобных сорбентов позволяет эффективно разделять как высокомолекулярную составляющую, так и ион металла (рис. 2) с высокой скоростью (5-10 мин). Сама структура монолитного сорбента и его модификация катион-анионообменниками практически исключает сорбцию макромолекулярной составляющей и иона металла на его поверхности, в отличие от традиционной эксклюзионной хроматографии, где гидролизованные формы металла могут необратимо сорбироваться на материале колонки необратимо.

Кроме того, применяемая хроматографическая система достаточно удобна в условиях радиохимического синтеза по причине экспрессности и возможности использования колонки повторно без отмывки сорбированной активности.

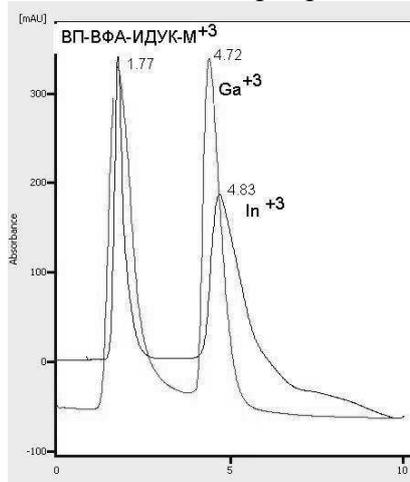


Рис. 2. Разделение реакционных смесей МПК ВА-ВФА-ИДУК и ионов галлия и индия. Колонка СИМ QА, градиентное элюирование HCl (рН 2) – ацетонитрил (15 мин)

В обоих случаях реакция протекала количественно. Доведение рН реакционной смеси до 7 не приводило к гидролизу. МПК оставались стабильными в растворе при физиологическом значении рН (7) в течение нескольких дней.

Обращает на себя внимание небольшое изменение гидродинамического радиуса при переходе от сополимера к МПК (табл. 1), что может быть объяснено реализацией гексакоординированной структуры $M(\text{ИДУК})_2$ с незначительным коллапсированием полимерного клубка.

Таблица 1. Молекулярно-массовые характеристики сополимера ВП-ВФА-ИДУК и МПК с индием и галлием, полученные методом эксклюзионной хроматографии и седиментации

Название образца	Время удерживания, мин	M_p Да	M_n Да	M_w Да	M_w/M_n (PDI)	MSD Да
ВП-ВФА-ИДУК	10.27	76800	24700	62300	2.5	42800
ВП-ВФА-ИДУК- Ga^{3+}	10.43	63300	25300	53300	2.1	44200
ВП-ВФА-ИДУК- In^{3+}	10.53	56600	24700	50900	2.06	44200

Одной из важнейших характеристик радиофармпрепаратов является стабильность в плазме крови. При экспериментальной невозможности провести такой тест используют HCR. Гистидин является важнейшей аминокислотой, а также мощным хелатором для металлов. В нашем случае провести реакцию с плазмой крови было невозможно ввиду близости ММ совокупности белков плазмы (50-60 кДа) к ММ изучаемого полимера, поэтому для проверки физиологической

стабильности МПК использовали НСР в нейтральных условиях при комнатной температуре. Анализ проводили методом эксклюзионной хроматографии, т. к. подбор условий разделения продуктов реакции на СИМ дисках оказалась трудоемкой задачей. Результаты представлены на рис.3 и 4. Видно, что комплекс ВП-ВФА-ИДУК-Ga стабилен в течение 60 мин (доля комплекса $Ga(His)_2$ - около 10 %), в то время как аналогичный комплекс индия претерпевал практически полную деструкцию.

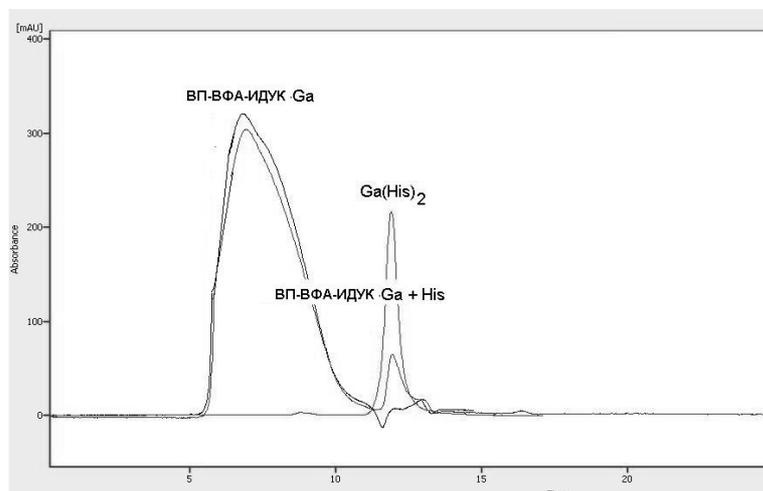


Рис. 3. НСР ВП-ВФА-ИДУК-Ga. Колонка Ultrahydrogel Linear 0.78x30см (элюент – 0.2 М NaCl, 0.8 мл/мин, 220 нм).

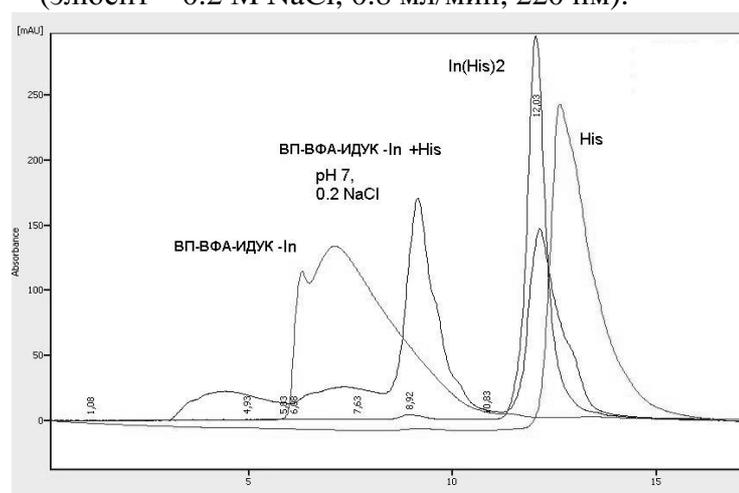


Рис. 4. НСР ВП-ВФА-ИДУК-Ga. Колонка Ultrahydrogel Linear 0.78x30см (элюент – 0.2 М NaCl, 0.8 мл/мин, 220 нм)

Этот факт, вероятно связан с тем, что галлий в силу меньшего ионного радиуса занимает координационные позиции в основном внутри полимерного клубка с реализацией сшивающей структуры $M(ИДУК)_2$, в то время как индий координируется более на поверхности и при взаимодействии с гистидином переходит в форму $In(His)_2^-$.

Заключение

Таким образом, нами отработана эффективная ВЭЖХ методика анализа МПК применительно к условиям реального радиохимического синтеза на ультракоротких монолитных ионообменных колонках. Показано, что МПК ВП-ВФА-ИДУК-Ga

может быть рекомендован для дальнейшего изучения и получения «горячего» аналога и его изучения *in vivo*.

Авторы выражают благодарность лаборатории чл.-корр. РАН, проф. Панарина Е. Ф. (ИВС РАН, С.-Петербург, Россия). Работа поддержана грантами РФФИ № 15-03-04170 и № 15-03-09340

Список литературы

1. Welch M.J., Redvanly C.S. Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications. Wiley. London. 2003, p. 848.
2. Панарин Е.Ф., Лавров Н.А., Соловский М.В., Шальнова Л.И. Полимеры - носители биологически активных веществ, С.-Петербург: ЦОП Профессия. 2014. 304 с.
3. Кирш Ю.Э. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. М.: Наука. 1998. 252 с.
4. Maurício M. et al. // *Mol. Pharmaceutics*. 2011. Vol. 8. No 2. pp. 609
5. Pirmettis I. et al. // *Pharmaceutical Research*. 2008. Vol. 21. No 7. pp. 1153
6. Mitra A. al. // *J. Controlled Release*. 2005. Vol.102. pp. 191
7. Панарин Е.Ф., Сантурян Ю.Г., Гаврилова И.И., Нестерова Н.А. Пат. РФ № 2243977. Бюлл. изобр. 2005. № 8.
8. Павлов Г.М. и др. // *Высокомолекулярные соединения*. 1990. Т. 32. № 6. С. 1190-1197.
9. Тихонова Л.И., Самойлова О.И., Панарин Е.Ф., Яшунский В.Г. // *Высокомолекулярные соединения*. 1973. Т. 15 Б. № 12. С. 874-877.
10. Виленчик Л.З. и др. // *Высокомолекулярные соединения* 1989. Т. 31 А. № 1 С. 204.
11. Красиков В.Д., Сантурян Ю.Г., Малахова И.И. // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2014. Т. 14. № 1. С. 42.
12. Maksimova E. et al. // *J. Sep. Sci*. 2013. Vol. 36. p. 3741
13. Lehenberger S. et al. // *Nucl. Med. Biol*. 2011. Vol. 38. P. 917
14. Gorshkov N., Murko A. Book of Abstr. 6th Monolith Symp. Portoros, Slovenia, 30.05-04.06. 2014. P 87.
15. Fang, J., Nakamura H., Maeda H. // *Advanced drug delivery reviews*. 2011. Vol. 63. No 3, pp. 136-151.

References

1. Welch M.J., Redvanly C.S., Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications, Wiley, London, 2003, p. 848/
2. Panarin E.F., Lavrov N.A., Solovskij M.V., SHal'nova L.I. Polimery - nositeli biologicheskii aktivnyh veshchestv, S.-Peterburg: COP Professiya. 2014. 304 p.
3. Kirsh YU. EH. Poli-N-vinilpirrolidon i drugie poli-N-vinilamidy, M., Nauka. 1998, 252p.
4. Maurício M. et al., *Mol. Pharmaceutics*, 2011, Vol. 8, No 2, P. 609.
5. Pirmettis I. et al., *Pharmaceutical Research*, 2008, Vol. 21, No 7, P. 1153.
6. Mitra A. et al., *J. Controlled Release*, 2005, Vol. 102, P. 191.
7. Panarin E.F., Santuryan YU.G., GavriloVA I.I., Nesterova N.A. Pat. RF № 2243977. Byull. izobr. 2005, No 8.
8. Pavlov G.M. et al., *Polymer Science*, 1990, Vol. 32, No 6, pp. 1190-1197.
9. Tihonova L.I., Samojlova O.I., Panarin E.F., YAshunskij V.G., *Polymer Science. Series B*, 1973., Vol. 15, No 12, pp. 874-877.
10. Vilenchik L.Z., Budtov V.P., Belen'kij B.G., *Polymer Science. Series A*, 1989, Vol. 31, No 1, P. 204.
11. Krasikov V. D., Santuryan Yu.G., Malahova I.I., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2014, Vol. 14, No 1, P. 42.
12. Maksimova E. et al., *J. Sep. Sci.*, 2013, Vol. 36, P. 3741.

13. Lehenberger S. et al., *Nucl. Med. Biol.*, 2011, Vol. 38, P. 917.

14. Gorshkov N., Murko A. Book of Abstr. 6th Monolith Symp. Portoros, Slovenia, 30.05-04.06. 2014. P. 87.

Горшков Николай Иванович - к.х.н., с.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Санкт-Петербург

Мурко Андрей Юрьевич – аспирант Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, Санкт-Петербург

Красиков Валерий Дмитриевич - д.х.н., в.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Санкт-Петербург, 199004, Санкт-Петербург, +7 (812) 323-71-01

15. Fang J., Nakamura H., Maeda H., *Advanced drug delivery reviews*, 2011, Vol. 63, No 3, pp. 136-151.

Gorshkov Nikolay I. - PhD, senior researcher, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, e-mail: lenchrom@hq.macro.ru

Murko Andrei Yu. – Research student, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.Petersburg

Krasikov Valerii D. - Dr.Sc.Chem., leading researcher, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, St.Petersburg, e-mail: lenchrom@hq.macro.ru.