

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Алексеева Анна Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КЛЕТКАМИ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ
ПРОЛЕКАРСТВАМИ**

Специальность 02.00.10 — Биоорганическая химия

Диссертация на соискание учёной степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Водовозова Елена Львовна

Москва – 2018

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ.....	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
2.1. Направленный транспорт наночастиц.....	10
2.1.1. Пассивный транспорт наночастиц — первое поколение систем направленного транспорта лекарств.....	10
2.1.2. Активный транспорт наночастиц — второе поколение систем направленного транспорта лекарств.....	14
2.1.3. Внутриклеточное нацеливание — третье поколение систем направленного транспорта лекарств.....	18
2.1.3.1 Пептиды, обеспечивающие проникновение в клетку.....	20
2.1.3.2 Нацеливание наночастиц в ядро клетки.....	20
2.1.3.3 Нацеливание наночастиц на митохондрии.....	21
2.1.3.4 Нацеливание на аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум.....	22
2.1.3.5 Нацеливание на лизосомы/эндосомы.....	23
2.2. Эндоцитоз наноразмерных частиц.....	24
2.2.1. Параметры наночастиц, влияющие на эндоцитоз.....	26
2.2.1.1 Размер.....	27
2.2.1.2 Форма и механические свойства.....	28
2.2.1.3 Модификация поверхности.....	29
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	32
3.1. Взаимодействие липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана и несущих углеводный лиганд селектинов, с эндотелиальными клетками сосудов крови.....	33
3.1.1. Объект исследования.....	38
3.1.2. Модель эндотелия сосудов опухоли, экспрессия E-селектина.....	40
3.1.3. Накопление липосом клетками HUVEC.....	42
3.1.4. Оценка количества интернализированных и связанных с клеточной мембраной липосом.....	47
3.1.5. Внутриклеточное распределение липосом.....	49
3.1.6. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом.....	51
3.2. Изучение механизма взаимодействия с опухолевыми клетками липосом,	

нагруженные липофильным пролекарством метотрексата.....	54
3.2.1. Объект исследования.....	59
3.2.2 Накопление липосом опухолевыми клетками.....	60
3.2.3. Изучение механизма эндоцитоза липосом клеткой.....	63
3.2.4. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом: мониторинг с помощью двойного флуоресцентного мечения.....	64
3.2.5. Синтез флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата.....	66
3.2.6. Внутриклеточное распределение липофильного пролекарства метотрексата.....	69
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	75
4.1. Материалы и реагенты.....	75
4.2. Методы.....	76
4.2.1. УФ-спектроскопия.....	76
4.2.2. Флуоресцентная спектроскопия.....	76
4.2.3. Проточная цитометрия.....	76
4.2.4. Конфокальная микроскопия.....	77
4.3. Приготовление и характеристика липосом.....	77
4.4. Культуры клеток.....	79
4.5. Экспрессия E-селектина клетками HUVEC.....	79
4.6. Накопление липосом с пролекарством мелфалана клетками HUVEC.....	80
4.7. Оценка количества интернализированных и связанных с клеточной мембраной липосом с пролекарством мелфалана.....	81
4.8. Внутриклеточное распределение SiaLe ^x -липосом с пролекарством мелфалана.....	82
4.9. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки SiaLe ^x -липосом с пролекарством мелфалана.....	82
4.10. Синтез флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата.....	83
4.11. Экспрессия фолатного рецептора опухолевыми клетками.....	86
4.12. Накопление липосом с пролекарством метотрексата опухолевыми клетками.....	87
4.13. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом с пролекарством метотрексата.....	88

4.14. Внутриклеточное распределение липофильного пролекарства метотрексата.....	88
5. ВЫВОДЫ.....	90
6. БЛАГОДАРНОСТИ.....	91
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92
Приложение 1.....	105

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛП	—	липофильное пролекарство
НЧ	—	наночастицы
ПЭГ	—	полиэтиленгликоль
РЭС	—	ретикулоэндотелиальная система
ФК	—	фолиевая кислота
ФНО- α	—	фактор некроза опухоли α
ФР	—	фолатный рецептор
ЭПР	—	эндоплазматический ретикулум
BODIPY	—	1,3,5,7-тетраметил-4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза- <i>s</i> -индаценил
BODIPY-MTX-DG	—	<i>rac</i> -1-[13-BODIPY-тридеcanoил]-2-олеоилглицеро-3-(β -аланил-N-карбонилметил)метотрексат
BODIPY-PC	—	1-пальмитоил-2-(7-BODIPY-гептаноил)- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин
CPP	—	пептиды, обеспечивающие проникновение в клетку
DCC	—	дициклогексилкарбодиимид
DMAP	—	диметиламинопиридин
DMSO	—	диметилсульфоксид
DPBS	—	фосфатный буферный физиологический раствор с солями кальция и магния
EDTA	—	этилендиаминтетрауксусная кислота
EEA1	—	early endosome antigen-1, маркер ранних эндосом
EPR	—	enhanced permeability and retention effect, эффект повышенной проницаемости и удерживания
HUVEC	—	эндотелиальные клетки, выделенные из пупочной вены человека
ICAM-1	—	inter-cellular adhesion molecule 1, CD54, молекула клеточной адгезии
Mlph	—	мелфалан
Mlph-DG	—	<i>rac</i> -1,2-диолеоил-3-мелфаланилглицерин
MTX	—	метотрексат

MTX-DG	—	<i>rac</i> -1,2-диолеоилглицеро-3-(β-аланил-N-карбонилметил)метотрексат
NLS	—	nuclear localization signal, сигнал внутриядерной локализации
PBS	—	фосфатный буферный физиологический раствор
PC	—	фосфатидилхолин
PE	—	фосфатидилэтаноламин
PFA	—	параформальдегид
PG	—	фосфатидилглицерин
PI	—	фосфатидилинозит
PS	—	фосфатидилсерин
PSGL-1	—	P-selectin glycoprotein ligand-1, лиганд P-селектина
RFC	—	reduced-folate carrier, белок-транспортер восстановленных фолатов
Rhod-PE	—	N-(лиссамин родамин В сульфонил)фосфатидилэтаноламин
SiaLe ^x	—	сиалил Льюис X, Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)-GlcNAcβ
SiaLe ^x -PEG ₈₋₁₅ -DG	—	конъюгат 3-аминопропилгликозида SiaLe ^x и <i>rac</i> -1,2-диолеоил-3-карбоксиметилен[поли(8-15)оксиэтилен]-оксиацетиламидопропионилглицерина
siRNA	—	малые интерферирующие РНК
TPP	—	катион трифенилфосфония
TFA	—	трифторуксусная кислота
Trf	—	конъюгат трансферрина с меткой Alexa-555
VEGF (EGF)	—	vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов
WGA	—	wheat germ agglutinin, агглютинин из ростков пшеницы

1. ВВЕДЕНИЕ

Поиск методов создания лекарственных средств, способных селективно (или направленно) действовать на больные органы и ткани – фундаментальная проблема медицинской науки и физико-химической биологии. Использование наноразмерных систем доставки лекарств представляется одним из наиболее рациональных подходов к решению этой проблемы, особенно в области онкологии, где применяются химиотерапевтические средства с высоким уровнем системной токсичности. Среди известных наноносителей липосомы, построенные из природных фосфолипидов, отличаются наибольшей био- и гемосовместимостью. Именно поэтому на мировом рынке наномедицинских препаратов, предназначенных для системного введения, средства на основе липосом занимают лидирующую позицию. Так, примером самого успешного липосомального препарата для противоопухолевой терапии является Doxil® – инкапсулированный в наноразмерные пегилированные (то есть покрытые полиэтиленгликольными остатками) липосомы доксорубин [1] – внедренный в клинику в 1995 году. К 2013 году к применению в клинике одобрены 19 препаратов на основе липосом [2]. Разработана технология эффективного инкапсулирования водорастворимых субстанций во внутренний объем липосом – метод *remote loading*, так называемая активная загрузка. Однако эта технология осуществима только для амфифильных слабых кислот или оснований, например, для антибиотиков антрациклинового ряда типа доксорубин [3]. При пассивном инкапсулировании раствора лекарства в липосомы добиться терапевтически значимой концентрации действующего вещества не удастся, поскольку внутренний водный объем наноразмерных липосом (как и других наноносителей) слишком мал.

Альтернативным способом загрузки липосом водорастворимыми лекарствами является включение лекарств в липидный бислой в виде липидных производных — липофильных пролекарств [4]. Такая конструкция липосомальных препаратов способствует улучшению их фармакологических свойств: позволяет получить наноразмерные липосомы с приемлемой емкостью загрузки, уменьшает вероятность потерь активного вещества при циркуляции в кровотоке и на стадии взаимодействия с клеткой-мишенью, потенциально облегчает внутриклеточную разгрузку за счет возможности прямого трансмембранного переноса липофильного пролекарства (ЛП). После интернализации клеткой ЛП расщепляются эндогенными ферментами с высвобождением активного агента. Однако внутриклеточный транспорт ЛП, доставленных в липосомальной форме, практически не изучался, в то же время, он играет важнейшую роль в реализации специфического действия лекарства на клеточном

уровне. Решающее влияние на внутриклеточное распределение пролекарства оказывает механизм проникновения липосомы-носителя в клетку — эндоцитоз. Поэтому исследование механизмов эндоцитоза наноразмерных липосом, нагруженных ЛП, и процессов их интернализации является актуальным.

В лаборатории химии липидов ИБХ РАН разработаны липосомы на основе природных фосфолипидов, содержащие ЛП широко используемых в клинике противоопухолевых препаратов – алкилирующего агента мелфалана и антиметаболита фолиевой кислоты метотрексата [5]. Соответствующим образом сконструированные пролекарства хорошо встраиваются в жидкофазный липидный бислой липосом. Терапевтическая эффективность липосомальных препаратов ЛП мелфалана (или сарколизина, D,L-мелфалана) и метотрексата подтверждена в экспериментах *in vivo* на моделях опухолей мышей. Показано значительное усиление противоопухолевого эффекта по сравнению с исходными лекарствами при лечении лейкоза P-388 [6] и аденокарциномы молочной железы [7]. При оснащении липосом углеводным лигандом селектинов сиалил-Льюис X (SiaLe^{X}) терапевтический эффект липосомальных препаратов возрастал еще более [7]. На модели карциномы легких Льюис показано, что ингибирование роста опухоли SiaLe^{X} -липосомами, нагруженными ЛП мелфалана, опосредовано их антивазкулярным действием [8]. Показано, что липосомы с ЛП метотрексата способны преодолевать резистентность клеток лейкемии человека к метотрексату, обусловленную мутациями и недостаточной функцией белка-транспортера восстановленных фолатов (наиболее частая причина выработки резистентности к метотрексату) [9]. Однако механизмы взаимодействий липосомальных форм ЛП мелфалана и метотрексата с опухолевыми клетками и эндотелиальными клетками опухолевых сосудов не исследовались.

Цель настоящей работы – исследование механизмов взаимодействия с клетками и внутриклеточного транспорта липосом с липофильными пролекарствами мелфалана и метотрексата с помощью флуоресцентных методов.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- изучить влияние введения SiaLe^{X} -лиганда в липосомы с ЛП мелфалана на взаимодействие с эндотелиальными клетками, в том числе:
 - сравнить накопление липосом интактными и активированными клетками и оценить специфичность взаимодействия липосом с E-селектином, представленным на поверхности клеток;
 - провести количественную оценку интернализированных и связанных с мембраной клеток липосом;
 - исследовать внутриклеточное распределение липосом и кинетику их внутриклеточной

разгрузки.

- изучить механизм взаимодействия липосом с ЛП метотрексата с опухолевыми клетками, в том числе:
 - сравнить накопление липосом клетками различных линий и оценить вклад потенциальных рецепторов в этот процесс;
 - исследовать механизм интернализации липосом клеткой с помощью ингибиторов эндоцитоза и оценить кинетику внутриклеточной разгрузки липосом;
 - синтезировать флуоресцентный аналог ЛП метотрексата для изучения внутриклеточного транспорта липосом;
 - исследовать внутриклеточное распределение ЛП метотрексата;

В данной работе впервые исследовано на внутриклеточном уровне влияние SiaLe^X-лиганда в липосомах на их взаимодействие с эндотелиальными клетками. Показано, что включение липофильного конъюгата SiaLe^X в состав липосом с ЛП мелфалана обеспечивает специфическое связывание с эндотелиальными клетками, активированными провоспалительным цитокином, после чего происходит быстрая (минуты) интернализация и внутриклеточная дестабилизация липосом, то есть разгрузка. Интактные (неактивированные) клетки связывают SiaLe^X-липосомы лишь незначительно. Такая селективность SiaLe^X-липосом, нагруженных цитостатическим препаратом, в отношении активированных эндотелиальных клеток открывает перспективу разработки эффективных противоопухолевых средств, так как для микроокружения опухоли характерен хронический воспалительный процесс.

Обнаружено, что включение в липосомы ЛП метотрексата способствует их взаимодействию с опухолевыми клетками. Для нормальных клеток этот эффект выражен слабее. Участие в процессе связывания потенциальных рецепторов — фолатного и транспортера восстановленных фолатов — не подтвердилось, однако есть основания полагать, что связывание липосом с ЛП метотрексата опосредовано неким рецептором. Показано, что эндоцитоз липосом с ЛП метотрексата осуществляется посредством нескольких механизмов, в том числе с помощью клатрин-независимого пути. Синтезирован новый зонд для изучения внутриклеточного распределения липосом — флуоресцентный аналог ЛП метотрексата. Показано, что связанные липосомы остаются на поверхности клетки не менее 1.5-2 ч и только затем начинается медленная интернализация, причем компоненты липосом поступают в клетку отдельно. Одним из объяснений такой «разборки» липосом до интернализации может быть постепенное слияние липидного бислоя липосом с цитоплазматической мембраной, предшествующее эндоцитозу.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой части обзора кратко излагаются принципы, лежащие в основе концепции наноразмерных систем доставки лекарств, и приводится анализ различных подходов к созданию супрамолекулярных средств, позволяющих направленно воздействовать на очаги патологии при системном введении в организм. При этом особое внимание уделяется липосомальным системам доставки лекарств, поскольку они достаточно давно применяются в клинике. Вторая часть посвящена рассмотрению процесса эндоцитоза наночастиц и тех их параметров, которые влияют на интернализацию клетками.

2.1. Направленный транспорт наночастиц

Создание наноразмерных систем доставки лекарств открывает перспективы для терапии тяжелых комплексных заболеваний (генная терапия, аутоиммунные заболевания, онкология). За свою историю, концепция системы доставки лекарств пережила скептическое отношение в 80-х, бурный рост интереса в 2000-х, создание огромного количества виртуозных лабораторных разработок, не имевших шанса на внедрение в практику, и, наконец, к настоящему моменту сложились представления о клинических возможностях такой концепции [10]. Разработка наномедицинских препаратов, действующих на основе пассивного транспорта, развивалась практически параллельно исследованиям по созданию так называемых таргетных (от англ. *targeting*, нацеливание) систем доставки лекарств, которые должны селективно доставлять фармацевтическую субстанцию в очаг патологии, то есть осуществлять ее активный транспорт. В последние годы появился новый многообещающий подход, позволяющий повышать и контролировать фармакологическую активность лекарств, действующих на внутриклеточные мишени — внутриклеточное нацеливание систем доставки лекарств [11]

В следующих разделах будут рассмотрены три уровня разработок в области направленного транспорта наночастиц для терапевтических и/или диагностических целей.

2.1.1. Пассивный транспорт наночастиц — первое поколение систем направленного транспорта лекарств

Открытие явления *пассивного транспорта* (то есть накопления) наноразмерных частиц в опухоли и очаги воспаления за счет эффекта EPR (*enhanced permeability and retention*) [12] послужило импульсом для бурного развития исследований в области разработки

наноразмерных систем доставки лекарств. Такие системы доставки предназначены для введения в системный кровоток для лечения и/или диагностики, в первую очередь онкологических заболеваний.

Физиология солидных (твёрдых) опухолей отличается от физиологии нормальных тканей рядом существенных признаков. В отличие от регулярной, упорядоченной васкуляризации нормальных тканей, сосуды опухолей, как правило, структурно и функционально аномальны и представляют собой деформированные капилляры с проницаемыми стенками и замедленным кровотоком [13]. Рост опухоли требует и непрерывного роста новых сосудов, т. е. ангиогенеза. Вновь сформированные кровеносные сосуды должны обеспечивать повышенное снабжение опухоли питательными веществами и кислородом. Ткани, богатые капиллярами (печень, селезёнка, костный мозг) или патологически изменённые ткани с повреждёнными и разупорядоченными капиллярами имеют сосуды с увеличенным размером пор, которые проницаемы для частиц диаметром 100–300 нм [13]. То есть, сама физиология сосудистой системы определяет повышенный уровень поглощения наночастиц в печени, селезёнке и опухолевых тканях. Вторым фактором, способствующим пассивному накоплению наночастиц именно в опухоли — нарушение лимфатического дренажа, поскольку растущая опухолевая ткань сжимает лимфатические сосуды и может приводить к их коллапсу, особенно в центральных областях опухоли [14].

Несмотря на то, что Матцумура и Маеда наблюдали эффект EPR еще в 1980-х годах, первоначально этому явлению не уделяли должного внимания. С тех пор в многочисленных исследованиях *in vivo* с помощью полимерных конъюгатов, мицелл, липосом и наночастиц было показано существование пассивного транспорта. Стала проясняться взаимосвязь структура-активность для нанолекарств, а также особенности опухоли, определяющие степень проникновения препарата за счет EPR-эффекта, которая может быть достигнута в доклинических испытаниях и у пациентов [15]. С течением времени стали очевидны и недостатки подхода пассивного нацеливания: из-за анатомических и (пато-)физиологических различий в развитии опухоли проявления EPR-эффекта существенно отличаются для разных моделей опухолей и для разных пациентов [16]. Кроме того, использование животных моделей в некоторых случаях может приводить к завышенным ожиданиям и неверной оценке терапевтического потенциала нанолекарств. Так, EPR-эффект гораздо более выражен для опухолей грызунов, чем для опухолей человека, просто потому что большинство опухолей у грызунов растут намного быстрее. Для сравнения, подкожно перевитая мышца опухоль вырастает до 1 см (0.5 г) за 2-4 недели, это соответствовало бы ~20 см и 1-2 кг опухолевой ткани у человека, которая развивалась бы годы, а не недели [17]. Из-за такого быстрого роста сосуды

опухоли в мышинных моделях часто не успевают правильно развиваться и, следовательно, образуется более дефектная сосудистая архитектура, через которую легче проникают наночастицы. У грызунов количество лекарства, накопившегося в опухоли за счет пассивного транспорта, обычно составляет от 1 до ~15% от введенной дозы в пересчете на массу животного [15]. Тем не менее, у человека встречаются опухоли с достаточной проницаемостью сосудов и хорошо выраженным эффектом EPR, например, опухоли с повышенной экспрессией VEGF и в целом хорошей васкуляризацией (это повышает статистическую вероятность появления дефектных сосудов). Классическим примером такой опухоли служит саркома Капоши, которая характеризуется множеством кровеносных сосудов (и множеством дефектных) и хорошо отвечает на лечение нанопрепаратами с пассивным нацеливанием. Для повышения терапевтического эффекта у пациентов, специалисты предлагают перед лечением нанопрепаратами проводить диагностическое исследование с контрастирующим наноразмерным агентом, чтобы оценить накопление в опухоли и на основании этих данных отбирать для дальнейшей терапии только тех пациентов, у которых наблюдали EPR-эффект [17].

Начальная скорость вывода из кровотока является главным фактором, определяющим эффективность пассивного транспорта. Небольшой период полувыведения, обусловленный захватом препаратов клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), элиминированием почками и (или) выведением рецепторами, не относящимися к опухоли, существенно уменьшают количество препарата действительно попадающего в опухоль. Следующим важным моментом после попадания наночастиц в опухоль является степень проницаемости сосудов опухоли. Строго указать предельные размеры для выхода (экстравазации) нанопрепаратов из кровеносных сосудов в ткань невозможно. Размер пор капилляров в опухоли может быть гораздо больше (от 100 нм до 2 μ м), чем в нормальной ткани, где обычно расстояние между эндотелиальными клетками составляет 2–6 нм, а в некоторых случаях даже больше пор в кровеносных сосудах печени (~150–200 нм), однако по мере развития опухоли поры капилляров непрерывно сужаются [13]. На определенной стадии опухолевой васкуляризации размеры пор капилляров позволяют экстравазировать наночастицам размером даже более 500 нм (и это было показано [15]), но со временем лишь наночастицы небольшого размера могут эффективно проникать из сосудов в ткань опухоли.

Для увеличения накопления нанопрепарата в опухоли за счет увеличения времени циркуляции часто используется технология Stealth, а именно, покрытие поверхности наночастиц высокогидрофильными остатками полиэтиленгликоля (ПЭГ), что делает частицы практически невидимыми для клеток РЭС. Однако, ПЭГ покрытие имеет и недостатки. В результате увеличения времени циркуляции может усилиться действие препаратов на здоровые

ткани, что может привести к неожиданным побочным эффектам.

Примером эффективного использования явления пассивного транспорта и EPR-эффекта служит создание липосомального противоопухолевого препарата Doxil [1]. В 1995 г Doxil стал первым липосомальным лекарством и первым нано-лекарством, одобренным FDA для применения в клинике. Препарат представляет собой дисперсию моноламеллярных Stealth-липосом (размером около 100 нм), нагруженных доксорубицином. На сегодняшний день в клинике применяется более 10 липосомальных препаратов, действующих по принципу пассивного транспорта в опухоли, и еще десятки проходят клинические испытания [2,18]. В целом такой подход остается весьма перспективным.

Итак, сочетание повышенной проницаемости капилляров с нарушением лимфатического дренажа обеспечивает накопление наночастиц в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью (эффект EPR) — пассивное нацеливание наноразмерных систем доставки лекарств в опухоли.

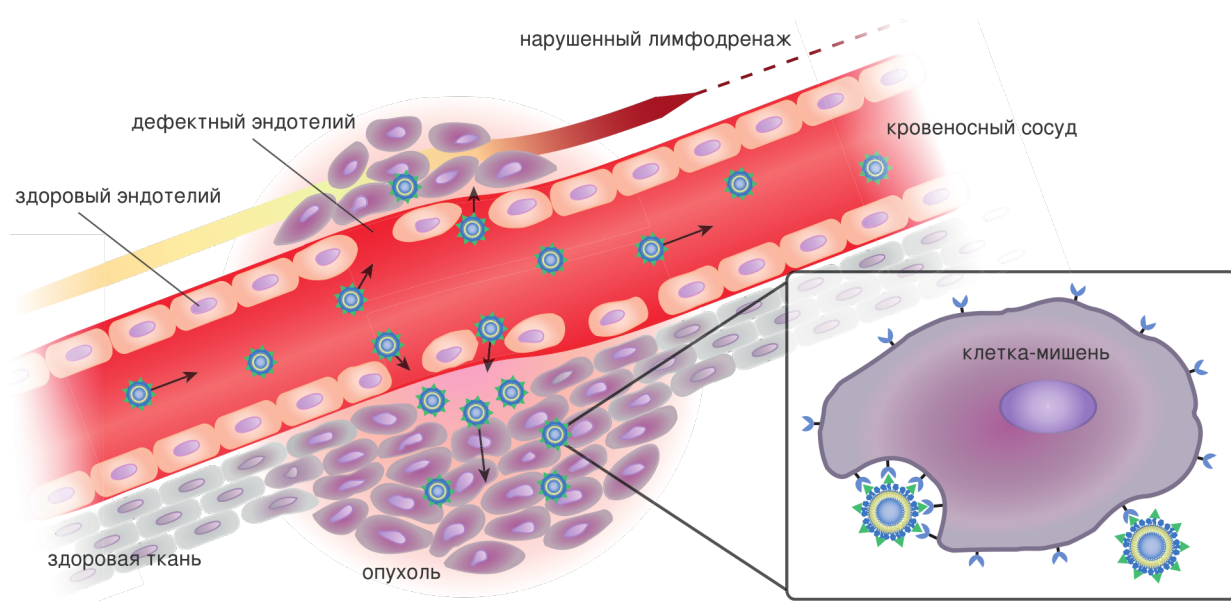


Рисунок 1. Схематическое представление концепции пассивного и активного транспорта нанопрепаратов в очаги воспаления и опухоли. Адаптировано из [19]

2.1.2. Активный транспорт наночастиц — второе поколение систем направленного транспорта лекарств

Вскоре после открытия липосом и появления данных об их успешном применении для доставки биологически активных веществ (в частности, антител [20]) начался поиск методов увеличения селективности действия систем доставки лекарств на целевые клетки.

Особые надежды возлагались на лечение рака с помощью таргетных, селективных нанолекарств, и сейчас концепция направленного транспорта лекарств с помощью специфических лигандов продолжает пользоваться популярностью в научной среде. Теоретически активный транспорт должен увеличивать селективность действия лекарства на клетки-мишени, уменьшать побочные эффекты и не оказывать действия на нецелевые клетки. К концу 70-х годов для липосом, несущих на своей поверхности антитела (иммунолипосомы), уже было показано специфическое связывание с клетками-мишенями и попадание в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза [2]. Параллельно с этими исследованиями активно развивались методики конъюгации антител и липидов для модификации липосом. Вскоре было показано, что иммунолипосомы с противоопухолевыми препаратами способны увеличить цитотоксическое действие в культуре клеток [21]. Однако *in vivo* проблема быстрого вывода иммунолипосом из кровотока за счет захвата клетками РЭС стала еще более острой. Тем не менее, для клеток-мишеней, находящихся в кровотоке или легко доступных из кровотока (форменные элементы крови, эндотелиальные клетки), было показано селективное накопление липосом [22]. После разработки ПЭГ-липосом, способных длительное время циркулировать в кровотоке, стало очевидно, что иммунолипосомы с таким покрытием теряют возможность для связывания с антигеном из-за экранирования антител остатками ПЭГ. Были разработаны новые подходы к модификации липосом антителами, фрагментами антител и другими лигандами — с введением ПЭГ-спейсеров. В начале 90-х гг. в группе Терезы Аллен (Канада) на модели рака легких мыши было показано увеличение выживаемости животных при лечении ПЭГ-иммунолипосомами с доксорубицином по сравнению с лечением ненацеленными липосомами [23]. Методы получения таргетных липосом по-прежнему остаются трудоемкими, трудно контролируемые, а получаемые системы плохо поддаются стандартизации и зачастую быстро выводятся из кровотока. Одним из подходов, позволяющих преодолеть эти сложности, стал метод пост-модификации липосом: мицеллы ПЭГ-липидов с ковалентно пришитым лигандом на дистальном конце ПЭГ смешиваются с уже готовыми нагруженными лекарством липосомами — в результате получаются таргетные липосомы [24]. Такой подход позволяет использовать более жесткие условия для получения липосом с высокой загрузкой лекарства и сохранять

лабильные молекулы лиганда, поскольку они вводятся на последней стадии.

Много усилий было потрачено на попытки разобраться в том, дает ли какие-либо преимущества активный транспорт липосом по сравнению с пассивным, и каковы перспективы такого подхода в клинике. В одних работах таргетные липосомы увеличивали продолжительность жизни экспериментальных животных по сравнению с ненацеленными липосомами, а в других — нет [2]. Липосомы — как оснащенные лигандами, так и без них — распределяются в тканях организма с помощью одних и тех же механизмов пассивного транспорта, если только взаимодействие с клетками РЭС не внесет коррективы. Следовательно, в случае одинакового времени жизни в кровотоке, таргетирование не увеличивает распределение липосом в целевую ткань по сравнению с пассивным транспортом. Таким образом, увеличение выживаемости животных при переходе к активному транспорту вызвано не увеличением накопления таргетных липосом в целевой ткани как таковым, а усилением захвата липосом клетками-мишенями путем рецептор-опосредованного эндоцитоза (т.е. при одинаковом накоплении в целевой ткани, увеличивается доля проникших в клетку-мишень и оказавших свое действие нацеленных липосом) [25].

Среди одобренных в клинике наномедицинских препаратов пока нет ни одного липосомального, полимерного или мицеллярного препарата с активным нацеливанием, хотя некоторые проходят клинические испытания и еще большее количество находятся на стадии доклиники. На сегодняшний день ко второй фазе клинических испытаний подошли два препарата с активным нацеливанием — это липосомальная форма оксалиплатина с нацеливанием с помощью трансферрина и липосомальная форма доксорубицина с анти-HER2 (ММ-302) [18]. Нанопрепарат ММ-302 представляет собой липосомы из дистеароилфосфатидилэтаноламина с ПЭГ-покрытием, несущие около 20 тыс. молекул доксорубицина во внутреннем водном объеме и около 45 молекул одноцепочечного анти-HER2 антитела (scFv) на поверхности. Недавно было показано, что ММ-302 в сочетании с терапией моноклональными антителами (Трастузумабом) способен взаимно усиливать противоопухолевый эффект [26]. К первой фазе клинических испытаний подошли также еще два липосомальных препарата, нацеленные на рецептор трансферрина, которые предназначены для генной терапии рака: катионные липосомы с привитым антителом к рецептору трансферрина, несущие ген p53 (препарат SGT-53) и липосомы с плазмидной ДНК RB94 (SGT-94) [18]. Такое небольшое число таргетных нанопрепаратов в клинике объясняется, в первую очередь, потерей ярких результатов при переходе от лабораторных исследований *in vitro* и даже на моделях экспериментальных животных на (до-)клинический уровень в связи с возникновением анатомических и физиологических барьеров. Их составляют слои

периваскулярных клеток, гладкомышечной ткани и фибробластов, которые отделяют опухолевые клетки от эндотелия кровеносных сосудов, высокая плотность клеток в солидных опухолях, а также высокое внутритканевое давление, характерное для опухолевой ткани. Эти факторы (а также барьер связывания, см. ниже) затрудняют проникновение нанопрепаратов вглубь опухолевой ткани и снижают вероятность попадания в клетку-мишень. Кроме того, следует учитывать и переоценку эффекта EPR, и недостаток адекватных животных моделей, которые лучше бы отражали бы физиологические особенности опухолей человека и с большей адекватностью могли бы предсказывать клинический ответ у пациентов. В результате нанопрепараты, нацеленные непосредственно на опухолевые клетки, редко превосходят ненацеленные по терапевтическому эффекту в клинических испытаниях [2,17].

Удачным подходом к повышению эффективности активного транспорта стало использование в качестве мишеней не самих опухолевых клеток, а нормальных клеток микроокружения опухоли – в первую очередь эндотелиальных клеток кровеносных сосудов. Нанопрепаратам, нацеленным на сосуды опухоли, не нужно проходить через периваскулярные слои клеток, преодолевать внутритканевое давление и пробиваться через плотные участки клеток, кроме того, они встречаются с целевым рецептором гораздо чаще, чем нацеленные на опухолевые клетки нанопрепараты. Поэтому есть все основания полагать, что именно нацеленные на эндотелиальные клетки нанопрепараты обладают гораздо большим потенциалом противоопухолевого эффекта (за счет нарушения снабжения опухоли кислородом и питательными веществами). Более того, в зависимости от конструкции такие препараты способны высвободить низкомолекулярное лекарство непосредственно в сосудах опухоли, где далее оно может легко проникать через барьеры и попадать вглубь опухолевой ткани [17,27].

Итак, ожидание обязательного улучшения накопления в опухолевой ткани за счет улучшения презентации нацеливающего на опухолевые клетки лиганда в составе нанопрепарата — это заблуждение. Как таковая доставка в опухоль осуществляется по принципу пассивного накопления (EPR-эффект). Только после прохождения через поры капилляров сосудов опухоли и проникновения в интерстициальную ткань таргетный нанопрепарат сможет связаться со своей мишенью, и только в этом случае он может оказаться более эффективным по сравнению с ненацеленными нанопрепаратами.

В быстро растущих модельных опухолях грызунов отсутствуют многие (пато-)физиологические особенности, свойственные приматам (слои периваскулярных клеток, гладкомышечной ткани, фибробластов, высокая плотность клеток в солидных опухолях и высокое внутритканевое давление), и опухолевые клетки могут располагаться непосредственно за эндотелиальными клетками. Но даже в такой ситуации накопление в опухолевой ткани

определяется пассивным накоплением за счет эффекта EPR, а для активного нацеливания появляется и новое ограничение – *барьер связывания*. Барьер связывания заключается в том, что таргетные нанопрепараты связываются с первым же встреченным своим рецептором и после этого уже не проникает дальше вглубь опухоли. Таким образом, ближайшие к сосудам сайты связывания быстро закрываются, а дальнейшее распространение затруднено.

Очевидное преимущество активного транспорта перед пассивным – это возможность таргетных нанопрепаратов задерживаться в опухоли на большее время, поскольку нацеливающие лиганды (при связывании с мишенью) препятствуют выводу обратно в кровоток. Итак, прежде чем реализовать свой направленный потенциал действия, нанопрепараты с активным нацеливанием подчиняются тем же закономерностям, что и пассивно нацеленные препараты. При этом наличие на поверхности наночастицы лиганда влияет на состав белковой короны, формирующейся при введении в кровоток, а значит, может уменьшить время циркуляции и понизить эффективность пассивного накопления [28,29].

Подтвержденное многими экспериментами и несомненное преимущество активного нацеливания – увеличение эффективности захвата нанопрепарата клетками-мишенями и изменение внутритканевого распределения по сравнению с ненацеленными препаратами. Ярким примером может служить работа Д. Кирпотина и Дж. Парка с соавт., где проводилось сравнение ненацеленных липосом, нагруженных доксорубицином, с иммунолипосомами (анти-HER2, (ErbB2, Neu)) [30]. Включение антитела в состав липосом не влияло на время жизни в кровотоке после в/в инъекции, но также и не увеличивало накопление иммунолипосом в опухоли (и те, и другие показали около 7-8% от введенной дозы на грамм опухоли, что довольно много). Однако распределение внутри опухоли было различным: иммунолипосомы находились внутри опухолевых клеток, а ненацеленные локализовались во внеклеточном пространстве или в макрофагах. В конечном итоге противоопухолевый эффект иммунолипосом значительно превысил таковой от ненацеленных, свободного лекарства и терапевтических антител (cure rates for immunoliposome-dox reached 50% (11 of 21) [31]).

Особый интерес представляют нанопрепараты, направленные на рецепторы, запускающие эндоцитоз. Наиболее успешными стали препараты, нацеленные на рецепторы трансферрина [32], HER-2 [33–35], альбумина [36,37], фолатные рецепторы [38–40], рецепторы липопротеинов низкой плотности [41], рецепторы эпидермального фактора роста [42]. Для создания таких нанопрепаратов используются полноразмерные антитела наряду с их фрагментами (мини-антитела, пептиды, иммуноконъюгаты). Так, лечение рака груди у HER2-положительных пациентов с помощью антител дает хорошие результаты в клинике (например, Трастузумаб при монотерапии метастазирующего рака молочной железы на фоне гиперэкспрессии HER2

сопровождается развитием ремиссии в 15% случаев), однако уменьшение кардиотоксичности и улучшение фармакокинетических показателей для повышения эффективности терапии стало возможным только при переходе к наносистемам. По прогнозам, комбинированное лечение липосомальным препаратом ММ-302 и антителами Трастузумаб может приводить к ремиссии в 50-75% случаев [26].

2.1.3. Внутриклеточное нацеливание — третье поколение систем направленного транспорта лекарств

Нацеливание наночастиц на определенную органеллу клетки-мишени — следующий шаг на пути повышения селективности действия лекарства. С начала 2000-х годов наблюдается постоянный рост числа публикаций, посвященных разработке систем доставки лекарств с внутриклеточным нацеливанием; в среднем за год публикуется около 10-15 оригинальных исследовательских работ (не считая обзоров) (см. например, [43–45]). Преимущество внутриклеточного нацеливания — понижение дозы вводимого в организм действующего вещества за счет повышения селективности его действия, что приводит к уменьшению побочных эффектов. Увеличение локальной концентрации наночастиц (НЧ) в целевой органелле уменьшает нагрузку на другие органеллы клетки и повышает эффективность действия лекарственного вещества, хотя в некоторых случаях зависимость между концентрацией НЧ в целевой органелле и биологическим эффектом нелинейна. Например, нет четкой корреляции между концентрацией siRNA в цитозоле (целевая органелла) и интерференцией гена-мишени. Большинство лекарств попадают в клетку посредством диффузии и равномерно распределяются в органеллах клетки. Химическая модификация низкомолекулярных лекарств для придания им селективности на уровне органелл клетки малоперспективна, так как часто приводит к потере активности субстанции. Кроме того, только небольшое число молекул подходят для такой модификации. Напротив, наноразмерные системы доставки лекарств способны обеспечивать нацеливание как на ткани и клетки, так и на клеточные органеллы без потери активности лекарства [46].

Основными мишенями для внутриклеточного нацеливания служат ядро, митохондрии, лизосомы и эндоплазматический ретикулум, поскольку они обеспечивают жизненно важные функции клетки — рост, пролиферацию и дифференцировку. Внутриклеточное нацеливание также особенно важно в случае нарушений клеточного метаболизма и связанных с ним заболеваний человека. На Рис. 2 представлены заболевания, связанные с состоянием определенных органелл клетки.

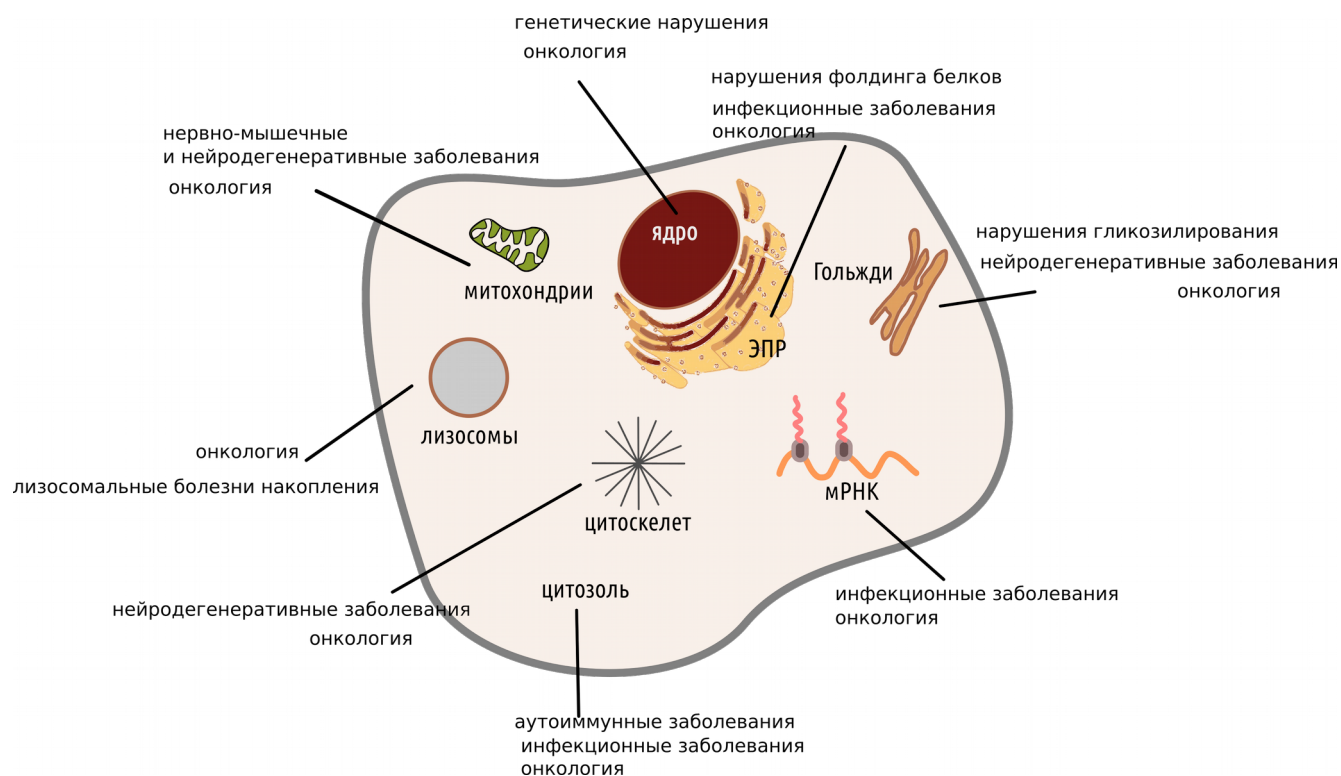


Рисунок 2: Органелло-специфические заболевания.

А. Майти и Д. Степенски провели анализ публикаций по тематике направленной внутриклеточной доставки наночастиц [47]. Для анализа были отобраны 77 публикаций, начиная с 1998 г. Авторы разделили системы доставки лекарств на четыре основные группы: НЧ (нанотрубки, наностержни и др.), липосомы, конъюгаты и квантовые точки. Оказалось, что большая часть работ посвящена НЧ (58%), половина из которых относится к наноразмерным системам доставки лекарств (размеры ~100 нм). Около 20% работ не содержало сведений о размерах системы — наиболее важной характеристики, определяющей взаимодействие с клеткой. Больше половины систем доставки (65%) содержало специфический нацеливающий лиганд: пептидной природы, заряженные и липофильные молекулы (48%, 12% и 5%, соответственно). Оснащение систем доставки лигандами чаще всего проводилось путем конъюгации с готовыми формуляциями, реже — на стадии получения (в первую очередь это касается липосом, в состав которых вводили нацеливающие агенты с гидрофобным якорем). Подавляющее число работ (90%) не содержало данных о плотности нацеливающих остатков на поверхности НЧ, в остальных она сильно варьировалась: от 1531 остатка до менее 10 остатков на 1000 нм². В 70 из 77 публикаций есть данные экспериментов *in vitro*, где специфические клеточные линии инкубировали с системами доставки и анализировали внутриклеточную

локализацию. В половине работ целевой органеллой выступало ядро клетки, в 33% — митохондрии, в остальных — ЭПР, аппарат Гольджи, лизосомы и др. Количественные данные об относительном содержании НЧ в целевой органелле отсутствуют в 77% работ.

Относительно небольшое число работ в этой области (по сравнению с другими системами доставки), отсутствие исчерпывающей информации о структурах частиц и разнообразие экспериментальных подходов к оценке внутриклеточного распределения делает практически невозможным выявление взаимосвязи между свойствами системы доставки (тип, размер, форма, модификация поверхности, стабильность) и эффективностью внутриклеточного нацеливания. Пока сложились лишь основные подходы к нацеливанию на важнейшие органеллы клетки. Они кратко рассмотрены ниже.

2.1.3.1 Пептиды, обеспечивающие проникновение в клетку

Плазматическая мембрана клетки-мишени — первый барьер на пути внутриклеточного нацеливания. Особый интерес к пептидам, обеспечивающим проникновение в клетку (Cell penetrating peptides, CPP) без затрат энергии и без токсического действия, вызван их способностью переносить и связанные с ними биомолекулы. Наиболее распространенные CPP — пептиды вирусного происхождения (TAT-пептид вируса ВИЧ-1, белок HSV-1 VP22), ДНК-связывающий домен локуса *antennapedia* дрозофилы и различные синтетические пептиды (полиаргинин и др.).

Механизм проникновения в клетку CPP до сих пор остается не выясненным. Описания процесса интернализации разнятся от энергонезависимого проникновения до захвата эндцитозом. В поздних работах показано, что на механизм интернализации CPP влияют размер и свойства соединенного с ним носителя, а также концентрация самого пептида. Некоторые CPP амфифильной природы способны оказывать токсическое действие на клетки, вызывая повреждения мембраны [48].

2.1.3.2 Нацеливание наночастиц в ядро клетки

Множество лекарств действуют на ДНК, приводя к блокировке репликации, уменьшению или ингибированию транскрипции ряда целевых генов.

Ядро клетки отделено от цитоплазмы двойной мембраной пронизанной ядерными порами. Весь пассивный и активный транспорт из цитоплазмы в ядро осуществляется через ядерные поры, которые имеют центральный канал диаметром 9 нм. Через него пассивно проходят молекулы менее 50 кДа. Для транспорта макромолекул большего размера необходимо дополнительно наличие клеточных сигналов внутриядерной локализации (nuclear localization

signal, NLS). Транспорт с участием NLS включает в себя энергозависимую стадию распознавания NLS соответствующим рецептором, который доставляет макромолекулу к ядерной поре, и далее она проникает в ядро с затратами энергии.

Исследования способности вирусов доставлять свой генетический материал в ядро клетки стимулировали появление систем вирусной доставки нуклеиновых кислот. Наиболее часто используются аденовирусы. Такой подход обеспечивает высокую эффективность доставки в клетку и затем в ядро, но имеет ограничения из-за возможных токсических эффектов компонентов вирусов. Небольшие пептиды вирусного происхождения, выступающие как NLS, например KKKRKV-пептид вируса SN40, используются для доставки в ядро [49].

Большинство природных NLS состоят из двух NLS-последовательностей соединенных спейсером из 10-12 а.к. Лучше всего охарактеризован NLS белка нуклеоплазмина, где последовательность KRPAATKKAGQAKKKKL обеспечивает доставку в ядро. Конъюгаты этой последовательности с белками, пептидами, ДНК и олигонуклеотидами эффективно переносятся через ядерную мембрану [43].

Эффективность доставки нуклеиновых кислот с помощью наночастиц может быть существенно повышена за счет включения в их состав NLS. Так, при оснащении липopleксов (комплексов плазмидной ДНК и катионных липидов) синтетическим аналогом пептида вируса SN40 экспрессия целевого белка увеличивалась в три раза [50].

2.1.3.3 Нацеливание наночастиц на митохондрии

В настоящее время при конструировании НЧ в основном ориентируются на два параметра митохондрий: потенциал мембраны и клеточные механизмы доставки белков в митохондрии. Для преодоления мембранного потенциала в НЧ вводят (конструируют из) митохондриотропные молекулы — это амфифильные молекулы, часто поликатионы и многие другие. Наиболее часто используется катион трифенилфосфония (TPP). Например, липосомы, несущие на своей поверхности катион TPP, показали повышенную активность инкапсулированного лекарства *in vivo* [51]. Накопление липосом с липидным конъюгатом TPP в клетках рака молочной железы BT-20 в опытах *in vitro* способствовало проявлению цитотоксического действия лекарств, причем внутриклеточное распределение липосом совпадало с митохондриями [52]. Использование митохондриотропных молекул особенно эффективно для доставки в митохондрии неполярных веществ, но не очень подходит для доставки полярных субстанций. Второй подход — использование пептидов. Большинство митохондриальных белков синтезируется в ядре клетки, а затем они транспортируются в митохондрии с помощью сигнальных пептидных последовательностей, обычно это 20-40 а.к. на

N-концевой цепи белка. Для ряда НЧ показано, что включение в их состав таких пептидов способно увеличивать накопление в митохондриях. Например, пептид KMSVLTPLLLRLTGSARRLPVPRAKC увеличивал доставку углеродных нанотрубок в митохондрии клеток HeLa [44]. Также разработаны эффективные синтетические пептиды, способные проникать в клетку и митохондрии [53]. Применение таких пептидных якорей более перспективно, чем поликатионов из-за меньшей токсичности.

2.1.3.4 Нацеливание на аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум

В клетке аппарат Гольджи отвечает за посттрансляционные модификации белков, включение сигнальных последовательностей, синтез протеогликанов и др. С нарушениями в работе аппарата Гольджи связывают группу из 15-ти врожденных нарушений гликозилирования, вызванных мутациями, чаще всего летальными, в соответствующих генах.

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представляет собой стопки мембран, разветвленную систему из окруженных мембраной уплощенных полостей, пузырьков и канальцев. При участии ЭПР происходит трансляция и транспорт белков, синтез и транспорт липидов и стероидов.

Аппарат Гольджи и ЭПР выступают как новые мишени для противоопухолевой терапии [54]. Обе органеллы являются частью секреторной машинерии клетки, обеспечивающей везикулярный транспорт белков к плазматической мембране.

Лин и соавт. показали, что мицеллы из ПЭГ-фосфатидилэтаноламина способны селективно накапливаться в ЭПР, запускать его стресс и инициировать ЭПР-зависимый апоптоз раковых клеток. Причем остаток фосфатидилэтаноламина в большей степени влиял на накопление в ЭПР, чем ПЭГ. Важно, что нормальные клетки преодолевали стресс и сохраняли жизнеспособность [55].

В группе Н. Зитсманн разработаны липосомы, состав которых схож с составом мембран ЭПР (PE:PC:PI:PS = 1.5/1.5/1/1 мол.) [45]. Такие липосомы транспортировались к ЭПР интактными, а затем сливались с мембранами ЭПР, так что уже через 30 мин после интернализации происходила разгрузка липосом в целевой органелле. Показано, что эндоцитоз таких липосом осуществляется с участием рецепторов липопротеинов низкой плотности и рецепторов-мусорщиков по механизму, опосредованному кавеолином и микротрубочками.

Особый интерес представляют нановакцины, нацеленные на ЭПР, так как именно в ЭПР происходит формирование главного комплекса гистосовместимости класса I, и эффективная доставка пептидных антигенов к ЭПР может существенно повысить его презентацию. Такие нановакцины на основе липосом и полимерных частиц показали эффективную доставку к ЭПР пептидных антигенов [56].

2.1.3.5 Нацеливание на лизосомы/эндосомы

Доставку в лизосомы/эндосомы надо рассматривать двояко. С одной стороны, активное вещество необходимо доставить непосредственно в лизосомы/эндосомы через рецептор-опосредованный эндоцитоз. С другой стороны, надо обеспечить своевременный выход активного вещества из этих органелл в цитоплазму, чтобы не допустить его деградацию.

Около 50 моногенетических заболеваний ассоциированы с нарушениями в работе лизосом, причем большинство из них относятся к категории лизосомальных болезней накопления. Лечение таких заболеваний с помощью нанопрепаратов представляется особенно перспективным. В лизосомах поддерживается кислый рН для осуществления процессов деградации молекул и аутофагии. Эндосомы же ответственны не только за деградацию биомолекул, но также участвуют в процессах рециркулирования молекул и рецепторов клеточной поверхности.

Для доставки НЧ из внеклеточного пространства к эндосомам/лизосомам в первую очередь используются молекулы и рецепторы, запускающие классический эндоцитоз. Для нацеливания на лизосомы/эндосомы внутри клетки используются сигнальные молекулы, аналогичные тем, которые сама клетка использует для доставки к лизосомам белков (растворимых и трансмембранных), синтезированных в ядре. Чаще всего это маннозо-6-фосфат, который распознается аппаратом Гольджи и затем доставляется к лизосомам/эндосомам [57]. Кроме этого используются два типа пептидных мотивов для нацеливания на лизосомы — тирозиновый и дилейциновый [58].

Для стимуляции выхода НЧ из эндосом применяют множество подходов, например, включение в состав НЧ фьюзогенных компонентов (пептидной или липидной природы), рН-чувствительных молекул и других агентов, разрушающих или формирующих поры в мембранах лизосом/эндосом [59]. Катионные полимеры, такие как полиэтиленимин, способны обеспечивать выход из эндосом посредством двух механизмов. Первый — это влияние полимера на мембрану эндосом — образование пор, через которые содержимое эндосомы высвобождается в цитозоль. Второй — инициация осмотического набухания эндосом по принципу протонной губки, что в конечном итоге приводит к их разрушению [60].

2.2. Эндоцитоз наноразмерных частиц

Эндоцитоз — основополагающий процесс, который клетка использует для интернализации отдельных молекул и макромолекул. Функции эндоцитоза в клетке не ограничиваются лишь доставкой питательных веществ, он играет главную роль в таких процессах как регуляция клеточных рецепторов (включая презентацию антигенов) и отдельных сигнальных каскадов, клеточная подвижность и митоз [61]. Кроме того, эндоцитоз это еще и основной путь, который используют бактерии и вирусы для проникновения в клетку [62,63].

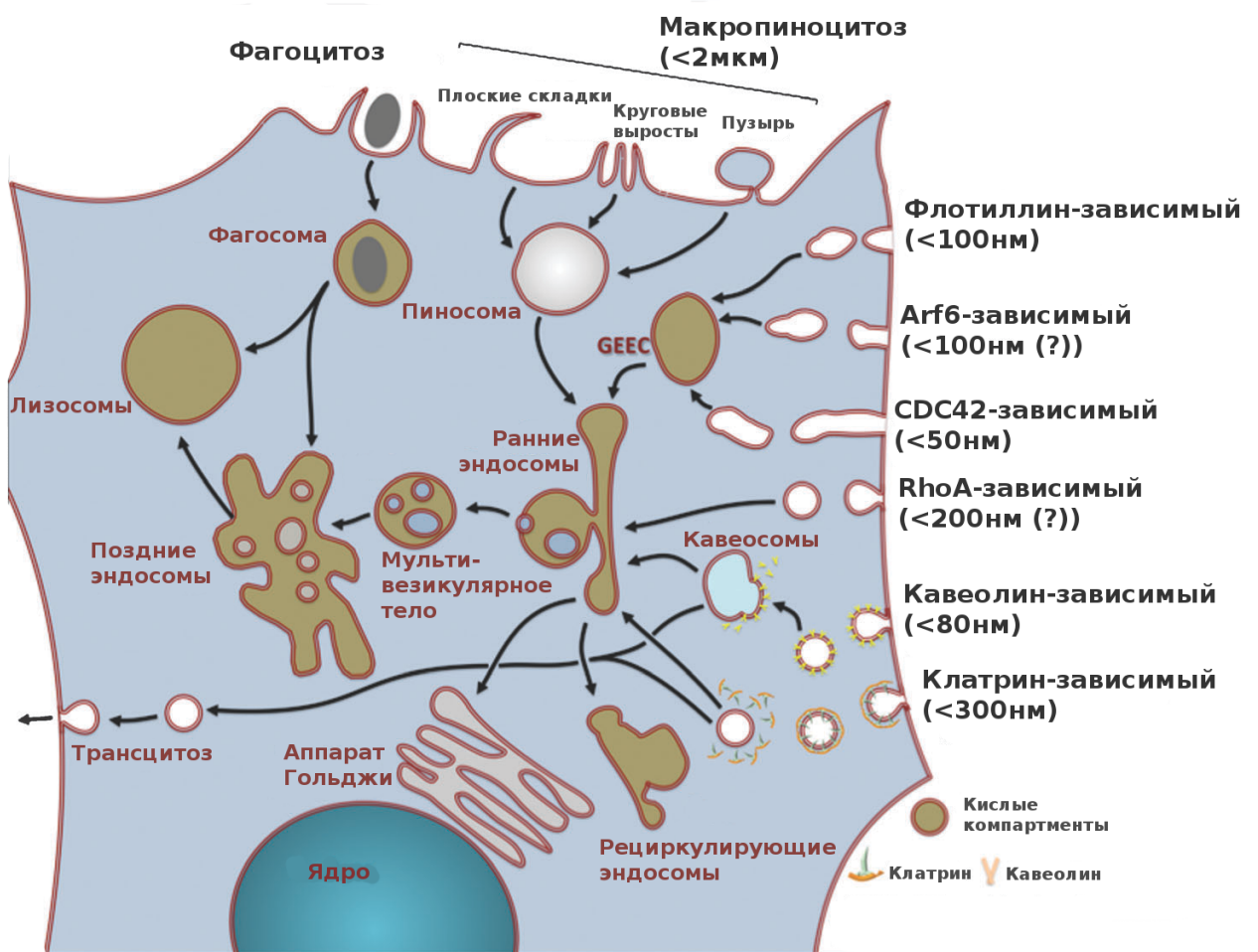


Рисунок 3: Механизмы поглощения внеклеточных объектов путем эндоцитоза в эукариотической клетке. Адаптировано из [64].

Принято классифицировать эндоцитоз поглощаемых внеклеточных объектов по их размеру на две категории: фагоцитоз (условно, захват твердых частиц) и пиноцитоз (захват веществ в жидкой фазе). Причем фагоцитоз характерен для ограниченного числа специализированных

клеток, а пиноцитоз является универсальным для большинства эукариотических клеток. Пиноцитоз далее разделяют еще на несколько механизмов, в основе которых лежат следующие этапы: 1) связывание со специфическим рецептором на поверхности клетки; 2) «отшнуровывание» плазматической мембраны; 3) фиксация получившейся везикулы и 4) транспортировка везикулы к целевой органелле клетки. Когда речь идет о взаимодействии НЧ с клеткой, необходимо понимать, что какими бы фантастическими ни были НЧ, они не способны запустить в клетке новые механизмы эндоцитоза — в клетку НЧ попадают только путем уже существующих и используемых клеткой механизмов.

Новые сведения о механизмах проникновения в клетку внеклеточных объектов, об устройстве внутриклеточных компартментов и функционировании молекулярных регуляторов позволяют сконструировать более эффективные наноразмерные системы доставки лекарств. В последние годы появилось много публикаций о влиянии различных параметров НЧ, в основном, нелипидного происхождения, на механизмы эндоцитоза. Действительно, «твердые» НЧ удобны в качестве инструментов для решения фундаментальных научных задач. Данные, полученные для НЧ разнообразной природы обобщаются и могут быть полезными при исследовании взаимодействий с клетками наноразмерных липосом, нагруженных липофильными пролекарствами. Наночастицы можно условно разделить на две категории по принципу их формирования: те, что образованы «сильными» взаимодействиями (ионные, металлические и ковалентные связи) и те, что образованы «слабыми» (водородные связи, гидрофильно-гидрофобные взаимодействия, электростатические силы и их комбинации). К первой группе относятся «твердые» НЧ, например, квантовые точки, наночастицы золота, углеродные нанотрубки, ко второй — «мягкие»: мицеллы, липосомы, некоторые полимерные частицы. Все НЧ характеризуются избыточной энергией площади поверхности, поэтому поверхностные силы доминируют над большинством других внешних взаимодействий. К поверхностным силам относятся: Ван-дер-Ваальсовы силы, гидрофильно-гидрофобные и электростатические взаимодействия, степень гидратации.

За время изучения НЧ накопились знания об их взаимодействиях с клетками, и появилась возможность выделить параметры НЧ, которые влияют на путь их интернализации. К таким параметрам относятся: размер, форма, заряд поверхности, модификация поверхности (наличие специфических лигандов и функциональных групп), гидратная оболочка и механические свойства наночастиц.

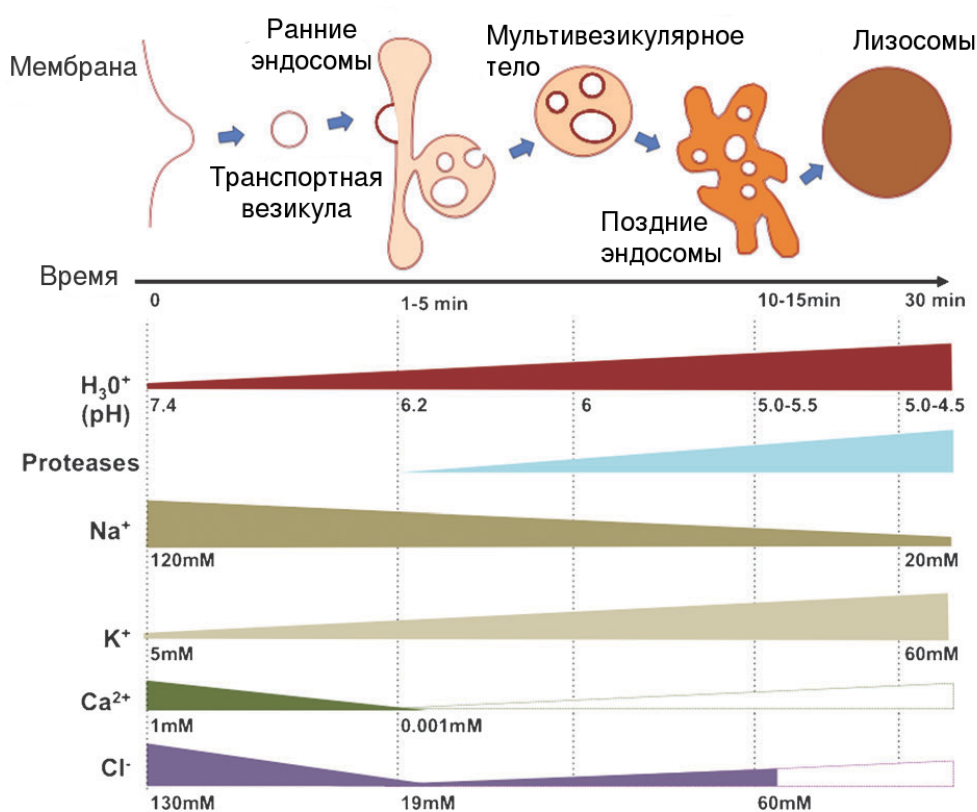


Рисунок 4: Сравнение эндосомальных компартментов. Адаптировано из [65,66].

2.2.1. Параметры наночастиц, влияющие на эндоцитоз

Прежде чем перейти к обсуждению отдельных параметров НЧ, влияющих на проникновение в клетку, следует отметить, что экспериментальные условия зачастую оказывают больший эффект на путь эндоцитоза, чем сами НЧ. В первую очередь, это тип клеток — фагоцитирующие или нет, опухолевые или нормальные, моноциты или макрофаги и т. д. [67]. Состояние клеток, их метаболическая активность, фаза клеточного цикла, размер и объем клетки, состав мембраны также могут влиять на поглощение НЧ [68]. Следующий важный экспериментальный параметр — это наличие или отсутствие белков сыворотки и ионная сила растворов. Агрегация и/или кластеризация НЧ при переходе в другие буферные системы может приводить к получению противоречивых результатов, поэтому размер НЧ необходимо строго контролировать. Белковое окружение НЧ, по некоторым данным, может целиком менять их биологическую активность и/или определять внутриклеточное распределение наряду с размером и формой наночастиц [69]. Кроме того, процесс эндоцитоза крайне динамичен: от 1 до 5% мембраны интернализуется в минуту путем рецепторно-опосредованного эндоцитоза [70],

около 2% плазматической мембраны занимают покрытые клатрином участки [71], а время жизни покрытых клатрином везикул составляет от 20 с до 2 мин. Транспортные везикулы, образующиеся на периферии клетки с помощью микротрубочек направляются к центру клетки со скоростью 1-2 мкм в секунду [72]. Среда в эндосомальных компартаментах также претерпевает значительные изменения и НЧ должны быть сконструированы с учетом этих особенностей (Рис. 4).

Далее рассмотрены наиболее важные параметры наночастиц, влияющие на взаимодействие с клетками и эндоцитоз.

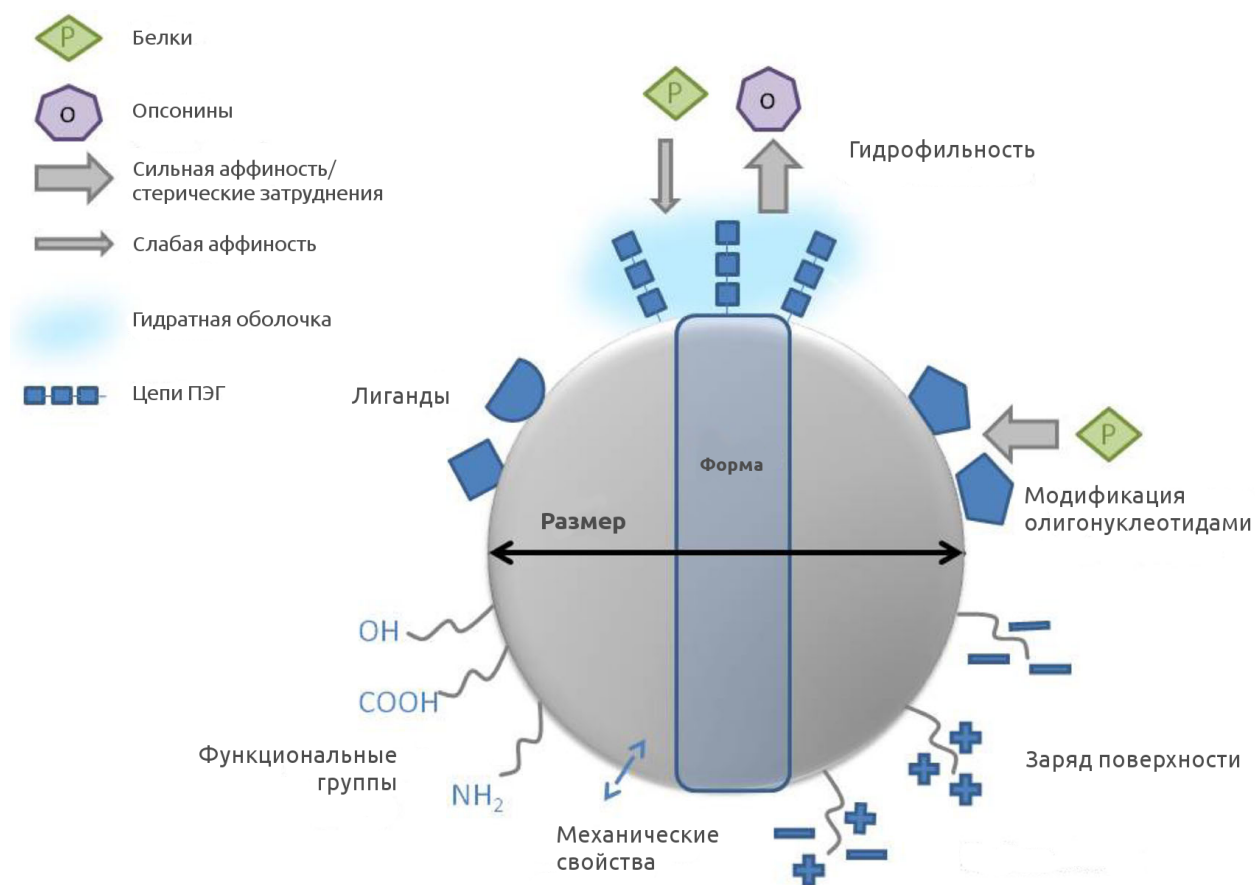


Рисунок 5: Параметры наночастиц, влияющие на эндоцитоз. Адаптировано из [73].

2.2.1.1 Размер

Некоторые пути эндоцитоза сильно зависят от размера интернализуемого объекта, а другие менее специфичны к нему. Например, фагоцитоз традиционно считается путем интернализации объектов микронного размера. Однако сейчас известны примеры фагоцитоза наноразмерных объектов, таких как вирусы [74], квантовые точки [75], золотые [76],

серебряные [77] и полимерные НЧ [78]. Следует отметить, что большинство путей эндоцитоза в клетке реализуется одновременно, поэтому идентификация одного отдельного пути — очень сложная задача. Обычно в таких экспериментах используются селективные ингибиторы, что может еще больше усложнить дело — ингибиторы токсичны, это повышает риск артефактов, а адекватные контроли не всегда удается подобрать. Поэтому рекомендуется использовать параллельно несколько селективных ингибиторов в диапазоне концентраций [79].

Наночастицы могут вызывать деформации и впячивания плазматической мембраны. Новаторские работы были проведены в лаборатории Липовски, где была теоретически рассчитана формула, определяющая минимально необходимый для интернализации размер НЧ [80]. Определяющими стали сила адгезии между НЧ и мембраной и упругость мембраны. Эти два параметра задают определенный диаметр НЧ, которая может быть полностью окутана мембраной и затем интернализирована. Эти теоретические соображения были подтверждены в экспериментах с золотыми и кремниевыми НЧ [81,82]. Показано, что для эффективного захвата клеткой минимальный радиус НЧ должен быть 20-30 нм [83,84]. На этот размер влияет несколько факторов. Чем выше энергия связывания между мембраной и НЧ, тем меньше минимальный радиус. Если НЧ несет специфические лиганды, минимальный размер и максимальное число интернализированных НЧ определяются плотностью привитого лиганда.

Показано, что размер НЧ влияет на эффективность эндоцитоза, то есть на количество НЧ, проникающих в клетку за определенный период времени. Хуокстра и соавт. обнаружили большое уменьшение в числе и скорости интернализации крупных НЧ по сравнению с 50-нм-НЧ [85]. Это согласуется с данными других авторов [86] о том, что некоторые нефагоцитирующие клетки лучше захватывают более мелкие НЧ. В ряде работ предлагают считать оптимальным размером для НЧ диаметр 50 нм (для разных НЧ и на разных типах клеток) [87,88].

Таким образом, хотя размер и важен, сам по себе он не может определить путь эндоцитоза, и другие параметры НЧ должны принести свой вклад.

2.2.1.2 Форма и механические свойства

Форма НЧ очень сильно влияет на интернализацию. Фактически, размер и форма — одни из определяющих параметров при взаимодействии наночастиц с клеткой.

Интересная попытка разделить влияние формы и размера на интернализацию была предпринята в работе при изучении взаимодействия с макрофагами микрочастиц разнообразной формы из полистирола [89]. Показано, что именно форма, а не размер, определяли индукцию фагоцитоза. Форма была охарактеризована как угол касательной между частицей и мембраной

клетки при первом контакте. Для несферических НЧ (эллипсоиды, диски и др.) при взаимодействии с клеточной поверхностью острым углом меньше 45 град фагоцитоз запускался преобразованиями актина, а при контакте с уплощенной поверхностью НЧ — деформацией плазматической мембраны. Если размер микрочастиц был слишком большой (площадь поверхности и объем, приближающиеся к параметрам клетки), макрофаги обволакивали их без интернализации.

На нефагоцитирующих клетках HeLa изучено влияние формы частиц катионного гидрогеля на поглощение клетками [90]. Частицы были цилиндрической формы с разным соотношением ширины и высоты и постоянным зарядом поверхности. Доминирующим путем проникновения для всех частиц стал пиноцитоз (неспецифический и рецепторно-опосредованный), но скорость и количество частиц попавших внутрь клетки зависели от их формы. Как и ожидалось, цилиндрические частицы диаметром 150 нм и длиной 450 нм захватывались клетками лучше всего, самый низкий уровень поглощения наблюдался для крупных частиц кубической формы (3 и 5 мкм). С другой стороны, цилиндрические НЧ золота меньшего размера на тех же клетках HeLa существенно уступали сферическим [91,92], что свидетельствует о большой роли кривизны поверхности НЧ при взаимодействии с клеткой.

Углеродные нанотрубки — пример НЧ, для которых форма сильно влияет на взаимодействия с клеткой. Джин и соавт. [93], изучая нанотрубки разной длины, выявили оптимум около 320 нм. Форма нанотрубок и их сильная гидрофобность позволяет им проникать в клетку физически «прокалывая» плазматическую мембрану [94]. Отчасти именно это свойство нанотрубок обуславливает их сильную токсичность.

Некоторые стадии эндоцитоза подразумевают деформацию интернализуемого объекта, и недавние исследования показали, что клетки способны оценивать жесткость объекта — механические свойства наночастицы. Так, упругость НЧ гидрогеля не влияла на эффективность поглощения макрофагами, но изменяла путь проникновения в клетку [95]. Более мягкие НЧ проникали в клетку путем макропиноцитоза, жесткие НЧ — по клатрин-зависимому пути, а НЧ средней жесткости интернализировались по нескольким механизмам эндоцитоза.

2.2.1.3 Модификация поверхности

При конструировании НЧ в их состав могут быть включены функциональные группы, полимерные цепи, гидрофильные/гидрофобные или заряженные молекулы, а также специфические лиганды. Все эти разнообразные модификации определяют свойства НЧ и помогают создать наиболее эффективную систему.

Поверхность большинства клеток имеет отрицательный заряд [96], очевидно поэтому

положительно заряженные НЧ должны лучше взаимодействовать с клеткой, а отрицательно заряженные хуже. Для придания НЧ положительного заряда чаще всего используются разнообразные амины, для отрицательного применяют карбоксильные группы, а нейтральные НЧ часто несут гидроксильную группу. Нейтральные НЧ по сравнению с заряженными обычно меньше поглощаются клетками [86,97]. Положительный заряд НЧ увеличивает их накопление как фагоцитирующими клетками, так и неспециализированными [98]. Однако избыточный положительный заряд часто служит причиной повреждения митохондрий и может индуцировать апоптоз, что сильно ограничивает применение таких наночастиц [94,99]. НЧ с отрицательным зарядом менее токсичны, но в большей степени взаимодействуют с белками, в том числе модуляторами иммунного ответа, что также накладывает ограничения на их применение. В любом случае, наличие заряда как такового облегчает взаимодействие НЧ с клетками.

Гидрофильность и гидрофобность НЧ сильно влияет на их коллоидную стабильность, взаимодействие с белками плазмы и поверхностью клеток. Вопрос о стабильности дисперсии в присутствии белков плазмы очень важен, и есть примеры, когда именно агрегация НЧ *in vitro* в культуральной среде изменяла картину поглощения НЧ клетками [100,101]. При переходе на уровень *in vivo*, от того, какие именно белки будут адсорбироваться на наночастице, зависит ее потенциал действия и дальнейшее биораспределение. Существенно снизить нежелательную адсорбцию белков позволяет пришивка гидрофильных полимеров к поверхности НЧ. В таком случае высокогидратированные цепи полимера формируют защитный слой, который практически непроницаем для других водорастворимых молекул (в первую очередь, белков). Чем выше плотность прививки цепей полимера и чем они длиннее, тем выше будет эффективность отталкивания белков. В качестве таких полимеров применяются ПЭГ, полисахариды (например, декстран [102]), поли-N-винилпирролидон [103], поливиниловый спирт [104] и др. Однако для применения НЧ в биологических и медицинских целях золотым стандартом считается ПЭГ. Такие НЧ показали лучшие результаты в тестах на иммуногенность и гемосовместимость *in vitro*, по сравнению с другими полимерными покрытиями [105,106]. Правда, именно с остатками ПЭГ связывают возникновение острых инфузионных реакций (вплоть до анафилактического шока) у части пациентов, проходящих терапию препаратом Doxil (см. Введение) [107].

В сочетании с ПЭГ-покрытием НЧ могут быть оснащены разнообразными лигандами для направленной доставки, которые способны повысить сродство НЧ к клеткам-мишеням. В разделе «Активный транспорт» были рассмотрены примеры таргетных нанолекарств.

Заключение

Анализ литературы показывает, что разработка наноразмерных систем доставки лекарств — активно развивающаяся область научных исследований. В клинике накоплено уже много данных об эффектах липосомальных препаратов. Однако механизмы взаимодействий наноразмерных липосом различной структуры с клетками изучены недостаточно. Еще меньше сведений можно найти о путях разгрузки липосом-носителей внутри клетки. В то же время, именно этот этап является определяющим для реализации специфического действия лекарства. Немногочисленные публикации об изучении внутриклеточного транспорта липосом (см. раздел 2.1.3) свидетельствуют о разнообразии вариантов этого процесса в зависимости от типа клеток и состава липосом.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидной причиной недостаточной изученности механизмов взаимодействий липосом-носителей с клетками и последующего внутриклеточного транспорта доставленных компонентов являются методологические трудности. Они заключаются не только в ограничениях по чувствительности, которые накладываются такими современными аппаратными методами исследований как конфокальная микроскопия и цитофлуориметрия, но и в необходимости работать с большими, несинхронизированными по фазе роста популяциями клеток. Другая проблема — наличие соответствующих изучаемому объекту молекулярных инструментов. В настоящей работе мы исследовали взаимодействия липосом, нагруженных липофильными пролекарствами двух цитостатических препаратов, с клетками различной природы с помощью флуоресцентных методов с применением аналогов липидных молекул. В том числе мы использовали синтезированный в ходе работы флуоресцентно-меченый аналог липофильного пролекарства.

3.1. Взаимодействие липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана и несущих углеводный лиганд селектинов, с эндотелиальными клетками сосудов крови

Вначале рассмотрим кратко имеющиеся представления о структуре и функциях селектинов, а также полученные ранее экспериментальные данные, которые послужили отправной точкой нашего исследования.

Селектины — L-, P- и E- (CD62) — углевод-связывающие адгезионные белки, представленные на поверхности активированных лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток. Селектины привлекают внимание исследователей как мишени для диагностических целей и доставки препаратов, блокирующих процессы воспаления и метастазирования [108]. Нацеливание на селектины позволяет доставлять нанопрепараты к эндотелиальным клеткам в очагах воспаления и опухолей. Как отмечалось в Обзоре литературы, в отличие от нацеливания непосредственно на опухолевые клетки, такой подход позволяет избежать ряда анатомических барьеров (слои периваскулярных, гладкомышечных клеток и фибробластов, разделяющие эндотелиальные клетки и опухоль) и повышенное внутритканевое давление в опухоли. Нацеливание на эндотелиальные клетки повышает вероятность обнаружения целевого рецептора, особенно если нанопрепараты длительное время находятся в кровотоке, и оказания токсического действия на клетку-мишень, что в конечном итоге приводит к разрушению сосудов опухоли, лишая ее поступления питательных веществ и кислорода.

Все три типа селектинов имеют схожее доменное строение: N-конец, кальций-зависимый лектиновый домен (включающий в себя сайт связывания с углеводным лигандом), EGF-подобный домен, несколько консенсусных повторов (2, 6 или 9 для L-, E- и P-селектина, соответственно), трансмембранный домен и внутриклеточный цитоплазматический домен. Каждый из доменов может быть N-гликозилирован. Несмотря на то, что селектины похожи по строению, их распределение в тканях и кинетика связывания с лигандами существенно различаются, что отражает их разнообразные роли в (пато)физиологических процессах.

Для экспрессии E-селектина на эндотелиальных клетках сосудов необходим внешний стимул и *de novo* синтезированная мРНК для продукции белка. В условиях *in vitro* максимальный уровень экспрессии E-селектина наблюдается через 4-6 часов после активации клеток интерлейкином-1, фактором некроза опухоли α (ФНО- α) или эндотоксинами, а затем стремительно падает — уже через 24 ч E-селектин не обнаруживается на поверхности клеток [109]. С поверхности клетки E-селектин интернализуется путем эндоцитоза [110], после чего

утилизируется без рециркуляции [111]. L-селектин постоянно экспрессируется на поверхности практически всех типов лейкоцитов и быстро переходит в секреторную форму (сбрасывается с поверхности) при активации цитокинами и хемокинами [112]. Экспрессия P-селектина на поверхности тромбоцитов и эндотелиальных клеток — индуцируемый процесс: в случае активации гистамином или тромбином P-селектин быстро переносится на плазматическую мембрану из телец Вайбеля-Паладе в эндотелиальных клетках или из альфа-гранул в тромбоцитах, где он запасается. В организме экспрессия селектинов строго регулируется и отражает течение многих (пато)физиологических процессов: развитие воспалительного ответа, миграция лейкоцитов, метастазирование и др. Ключевая роль E- и P-селектинов в формировании спонтанных метастазов в легких была впервые установлена *in vivo* на мышшиной модели рака толстой кишки [113].

Проблема идентификации функционально значимых лигандов селектинов из множества молекул, для которых показано связывание с селектинами *in vitro* в стационарных условиях, все еще сохраняется [114]. Задача поиска лигандов осложняется тем, что для селектинов характерны взаимодействия по принципу усиления силы связывания под действием внешней силы (catch bond behavior), в физиологических условиях такой внешней силой выступает ток крови. Впервые это было экспериментально продемонстрировано в 2003 г. для P-селектина [115], где время жизни комплекса P-селектина с лигандом PSGL-1¹ увеличивалось в условиях ламинарного потока (приближение к физиологическим условиям кровотока). При переходе к супрамолекулярным системам, таким как липосомы, распознавание лигандов также может изменяться в зависимости от наличия внешнего воздействия. Например, эндотелиальные клетки по-разному связывают липосомы с различными пептидными лигандами в стационарных условиях и в условиях потока: липосомы, специфичные к аминопептидазе N, в два раза лучше накапливаются активированными эндотелиальными клетками в стационарных условиях, липосомы же, специфичные к VCAM-1, накапливаются в клетках в 100 раз лучше в условиях потока [116].

Минимальным мотивом, достаточным для связывания всех трех селектинов, служит тетрасахарид сиалил Льюис X (**SiaLe^x**, CD15, Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)-GlcNAc β) [117]. Тетрасахарид SiaLe^x является компонентом гликанов в составе гликопротеинов и гликолипидов большинства циркулирующих лейкоцитов и некоторых эндотелиальных клеток. В условиях *in vitro* аффинность селектинов к изолированному тетрасахариду SiaLe^x (моновалентные взаимодействия в стационарных условиях) достаточно низка [112]. Установлено, что для комплекса E-селектина и SiaLe^x характерно увеличение времени жизни в определенных

¹PSGL-1 — P-selectin glycoprotein ligand-1, лиганд P-селектина

режимах потока [118,119]. Недавно с помощью молекулярного моделирования, малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и кристаллографического анализа для этого комплекса впервые получены данные о конформационных изменениях, обеспечивающих увеличение аффинности связывания в условиях потока [119].

Использование тетрасахарида SiaLe^x в качестве нацеливающего на E-селектин агента для наноразмерных липосом в публикациях встречается гораздо реже, чем использование антител или лигандов пептидной природы. Критическими параметрами для эффективного нацеливания липосом, оснащенных антителами к E-селектину, является строение липидного якоря и ПЭГ-спейсера, соединяющего антитело с липидным якорем [120]. Кроме того, аффинность возрастает при формировании поливалентных взаимодействий, например, в случае липосом с жидким бислоем, за счет латеральной диффузии конъюгатов антител с липидами [121]. Наличие экранирующих ПЭГ-липидов также оказывает сильное влияние на нацеливающий потенциал иммунолипосом [122]. При включении в состав липосом катионных липидов и рН-чувствительных молекул специфичность иммунолипосом к активированным эндотелиальным клеткам сохраняется, хотя в условиях стационарного эксперимента *in vitro* (без потока) наилучшие результаты обычно демонстрируют классические липосомы без дополнительных модификаций [123]. Тетрасахарид SiaLe^x также применялся для получения таргетных липосом. Противовоспалительные кардиопротекторные свойства пегилированных SiaLe^x-липосом (без включения какого-либо лекарства) впервые были показаны на модели ишемической болезни сердца у кошек [124]; эти липосомы ингибировали клеточную адгезию, опосредованную E-селектином [125], а также адгезию опухолевых клеток к эндотелиальным клеткам *in vitro* (адгезия, опосредованная E-селектином эндотелиальных клеток — ключевой этап метастазирования опухолей) [126]. Но применение SiaLe^x-лиганда для направленной доставки липосом с противоопухолевыми средствами впервые предложено и осуществлено в работе коллектива из ИБХ РАН [7]. Японские ученые разработали стабильные 100-нм липосомы на основе высокоплавких фосфолипидов и ганглиозидов, несущие на поверхности сывороточный альбумин (для защиты от опсонизации в кровотоке) и SiaLe^x-лиганд, и успешно применили их для биоимиджинга на моделях мышей с артритом и асцитной карциномой Эрлиха [127], а также для доставки дексаметазона на модели аутоиммунного увеоретинита мышей [128] и доксорубицина — с целью предотвращения стеноза поврежденной сонной артерии крысы [129]. SiaLe^x-Липосомы, нагруженные коллоидным золотом, успешно использовали в качестве контрастирующего агента для обнаружения воспаленных суставов мыши [130]. С помощью электронной микроскопии показано, что липосомы накапливаются не только в эндотелиальных клетках, но и в окружающих клетках за пределами воспаленных сосудов уже через 6 ч. после

в/в инъекции. В частности, липосомы были обнаружены в лизосомах макрофагов воспаленной синовиальной оболочки. Доставка олигонуклеотидов в составе липосом к активированным эндотелиальным клеткам *in vitro* была существенно улучшена при оснащении их SiaLe^x лигандом [131]. При сравнении эффективности ингибирования адгезии опухолевых клеток к эндотелию с помощью SiaLe^x-липосом различного строения, наилучший результат показали липосомы с привитым SiaLe^x-лигандом на дистальном конце ПЭГ-цепи: адгезия клеток HT-29 ингибировалась на 60-80% при всех режимах инкубирования (иммобилизированный E-селектин, эндотелиальные клетки HUVEC или трансфицированные CHO) [126].

Ранее в лаборатории химии липидов ИБХ РАН был синтезирован липидный конъюгат SiaLe^x, предназначенный для встраивания в бислою липосом [132] (**Рис. 6**). Тетрасахарид соединяется с мембранным якорем олигоэтиленгликольной вставкой, за счет которой лиганд экспонируется над поверхностью липосомы для обеспечения эффективного взаимодействия с рецептором-селектином на поверхности клетки-мишени. Было исследовано влияние SiaLe^x-липосом, нагруженных липофильным пролекарством мелфалана M₁ph-DG, на микрососуды опухоли на модели карциномы легких Льюис. Показано, что препарат оказывает специфический антивазкулярный противоопухолевый эффект при внутривенном введении. С помощью конфокальной микроскопии изучена внутриопухолевая локализация флуоресцентномеченых липосом [8]. В случае SiaLe^x-липосом наблюдалась их колокализация с маркером сосудистого эндотелия CD31, тогда как безадресные M₁ph-DG-липосомы накапливались в межклеточном пространстве периваскулярной области опухоли и в опухолевых клетках. То есть в отсутствие адреса липосомы экстравазировали в опухоль за счет пассивного транспорта, а введение SiaLe^x-конъюгата обеспечивало их активный транспорт к эндотелию опухолевых сосудов. В итоге подавление роста опухоли было более выраженным для SiaLe^x-липосом, особенно в случае отсроченного введения препарата [8]. Логично было предположить, что именно взаимодействие SiaLe^x-липосом с E-селектином повлияло на их распределение в опухолевой ткани и внесло наибольший вклад в проявление антивазкулярного цитотоксического эффекта. Кроме того, в наших предварительных экспериментах с клетками рака молочной железы человека HBL-100 и промиелоидными клетками HL-60 наличие SiaLe^x-лиганда никак не влияло на накопление липосом, нагруженных M₁ph-DG: липосомы быстро связывались клетками, уже через 15 мин инкубации интенсивность сигнала флуоресценции составляла половину максимального, а через 1 ч кривая процесса медленно выходила на плато (данные не приведены). Такой результат объяснялся естественным отсутствием экспрессии селектинов на опухолевых клетках.

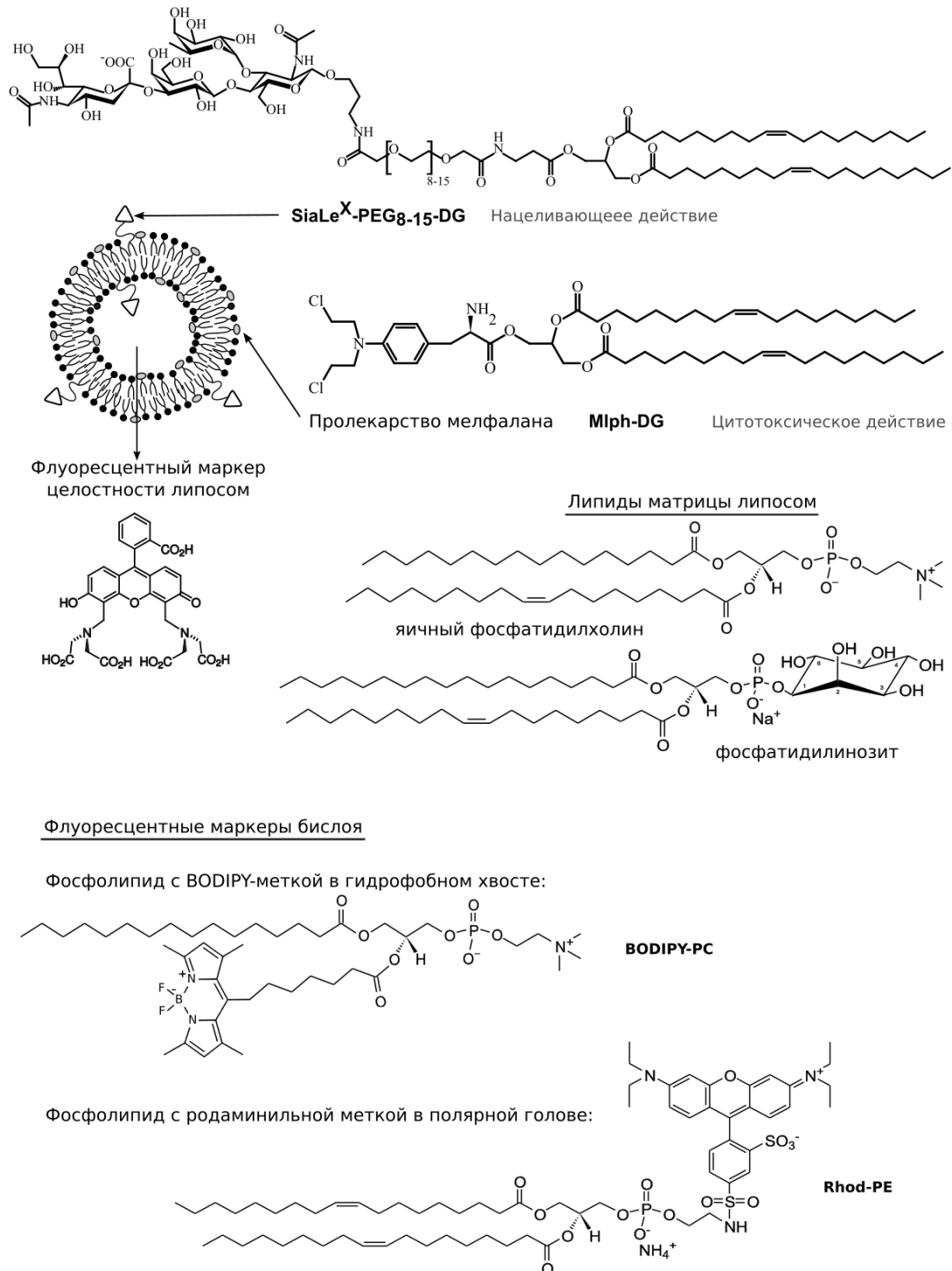


Рисунок 6: Молекулярные структуры компонентов липосом. Приведены репрезентативные структуры природных липидов матрицы липосом – яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита пекарских дрожжей – и формулы липофильного конъюгата SiaLe^X, пролекарства мелфалана Mlph-DG, флуоресцентных фосфолипидных зондов и кальцеина.

Задачей данной части диссертационной работы стало изучение влияния введения SiaLe^X-лиганда в противоопухолевые липосомы на взаимодействие с эндотелиальными клетками *in vitro*. Для решения поставленной задачи были намечены следующие этапы: (1) подбор оптимальной модели эндотелия сосудов опухоли с достаточным уровнем экспрессии E-селектина; (2) сравнение накопления липосом, оснащенных SiaLe^X-лигандом, и липосом без лиганда в активированных эндотелиальных клетках, оценка специфичности взаимодействия с E-селектином; (3) количественная оценка интернализованных и связанных с мембраной клеток липосом; (4) изучение внутриклеточного распределения SiaLe^X-липосом и оценка внутриклеточной разгрузки липосом.

3.1.1. Объект исследования

Изучение взаимодействий с эндотелиальными клетками проводили для липосом, нагруженных пролекарством мелфалана Mlph-DG, и несущих углеводный лиганд SiaLe^X. Мелфалан (L-сарколизин) — химиотерапевтический цитотоксический агент алкилирующего типа, действующий независимо от стадии клеточного цикла и обладающий широким спектром противоопухолевой активности. Из-за низкой стабильности при физиологических значениях pH и быстрого выведения из кровотока мелфалан вводится в больших дозах, вызывая тяжелые побочные эффекты. В связи с этим актуальна разработка его липосомальной формы. Как таковой мелфалан не удается эффективно инкапсулировать в наноразмерные липосомы из-за малой растворимости в воде и относительно быстрого гидролиза в нейтральной среде, с одной стороны, и высокой вероятности утечки сквозь липидный бислой, с другой. Введение мелфалана в мембрану липосом в виде Mlph-DG позволяет преодолеть указанные ограничения.

Таблица 1. Размеры липосом с различным содержанием SiaLe^X-лиганда, данные динамического лазерного светорассеяния^a

% SiaLe ^X , мол.	D (нм)	PDI
2%	109 ± 2.4	0.142
5%	111 ± 3.0	0.113
10%	108 ± 2.4	0.132

^a D - средний диаметр; PDI – индекс полидисперсности; приведены средние значения ± SE измерений.

Все молекулярные компоненты супрамолекулярной липосомальной системы приведены на **Рисунке 6**. В липидный бислой, построенный из яичного фосфатидилхолина (PC), фосфатидилинозита из *S. cerevisiae* (PI) и Mlph-DG (PC—PI—Mlph-DG, 8 :1 :1 (мол.)),

дополнительно включали BODIPY- или Rhod-меченый фосфатидилхолин (BODIPY-PC, от 0.5 до 2% мол., Rhod-PE 1% мол.) на стадии получения липидной пленки. Для изучения особенностей специфического связывания в состав липосом вводили от 2% до 10% углеводного вектора — липофильного конъюгата SiaLe^X-PEG₈₋₁₅-DG, уменьшая содержание PC (X%-SiaLe^X-липосомы, где X мол. содержание SiaLe^X-конъюгата). В качестве контрольных, выступали липосомы без SiaLe^X-лиганда, нагруженные M1ph-DG. Для отслеживания стабильности липосом, а также динамики их внутриклеточной разгрузки во внутренний водный объем включали кальцеин. Состав и концентрация липосомальной композиции были подобраны таким образом, чтобы обеспечивать надежное детектирование флуоресцентного сигнала в образцах, но не достигать цитотоксических доз пролекарства мелфалана.

Стабильность липосом, нагруженных M1ph-DG, была изучена ранее [9]. Однако влияние температуры и самой культуральной среды на стабильность SiaLe^X-липосом было неизвестно. По данным динамического лазерного светорассеяния, включение в состав липосом от 2% до 10% мол. SiaLe^X-лиганда не приводит к изменениям в размере липосом (Таблица 1); инкубации при 4°C и 37°C в течение 1 ч в физиологическом растворе на фосфатном буфере (PBS), pH 7.4 или в культуральной среде также не влияют на размер липосом (Таблица 2). Целостность SiaLe^X-липосом была протестирована по вытеканию кальцеина: липидный бислой был стабилен в буфере и культуральной среде весь период наблюдения (60 мин). Незначительное высвобождение кальцеина (около 4% от максимального) наблюдалось лишь в начальный момент времени, что связано, очевидно, с десорбцией остаточного кальцеина с поверхности липосом из-за разбавления образца.

Таблица 2. Влияние среды и температуры на размер липосом после 60 мин инкубации, данные динамического лазерного светорассеяния^a

Условия инкубации	Контрольные липосомы, без лиганда		2%-SiaLe ^X -липосомы	
	D (нм)	PDI	D (нм)	PDI
PBS, 4°C	96 ± 1.3	0.062	91 ± 2.5	0.055
PBS, 37°C	98 ± 0.9	0.085	90 ± 0.4	0.052
Культуральная среда без сыворотки, 4°C	99 ± 2.0	0.074	92 ± 1.2	0.062
Культуральная среда без сыворотки, 37°C	102 ± 1.1	0.069	91 ± 1.0	0.094

^a D - средний диаметр; PDI – индекс полидисперсности; приведены средние значения ± SE измерений

3.1.2. Модель эндотелия сосудов опухоли, экспрессия E-селектина

Для проведения исследований по взаимодействию липосом с эндотелиальными клетками *in vitro* важен выбор подходящей модели эндотелия. В лабораторной практике наиболее часто используют три подхода к работе с эндотелиальными клетками и клеточными маркерами эндотелия: 1) первичные культуры (из пупочной вены человека, артерии крупного рогатого скота и др.); 2) гибридные культуры (такие как EA.hy926); и 3) трансфицированные стандартные опухолевые линии со стабильной экспрессией целевого белкового маркера.

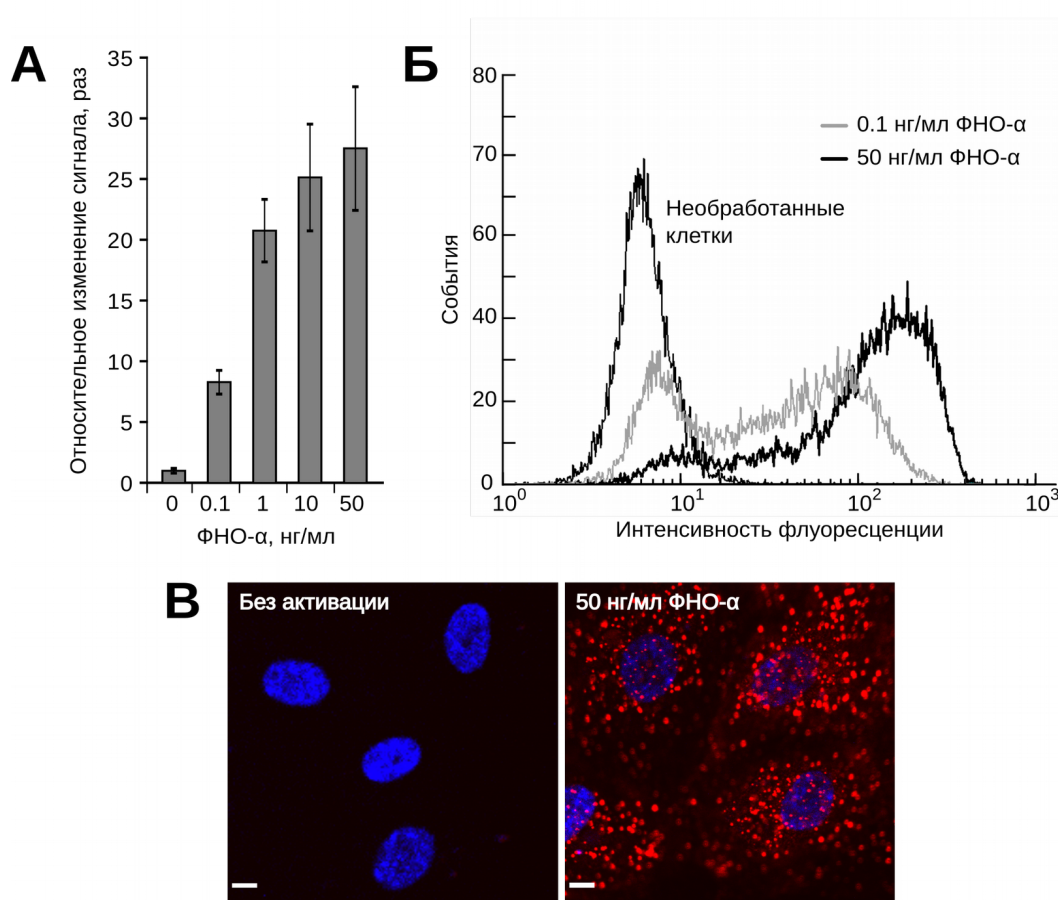


Рисунок 7: Экспрессия E-селектина на поверхности эндотелиальных клеток HUVEC. **А.** Клетки после активации различными концентрациями ФНО- α суспендировали с помощью EDTA, инкубировали с антителами к E-селектину человека 1 час при 4°C, затем окрашивали вторичными FITC-антителами еще 1 ч при 4°C и анализировали на проточном цитометре; средняя интенсивность флуоресценции по всей популяции клеток для трех независимых экспериментов, среднее \pm SD. **Б.** Типичные гистограммы распределения клеток по интенсивности окраски на E-селектин; выделяются три популяции клеток с высоким, средним и низким ответом на активацию ФНО- α . **В.** Конфокальная микроскопия монослоя клеток HUVEC с или без активации после окраски на E-селектин (клетки инкубировали 1 ч при 37°C с первичными Ат, окрашивали ядра Hoechst (синий), фиксировали и окрашивали вторичными Ат Alexa-555 (красный) 1 ч при 37°C; масштабная линейка 5 мкм.

Гибридные эндотелиальные культуры широко применяются благодаря их способности неограниченно делиться и относительной простоте культивирования. Однако при гибридизации неизбежно теряется способность экспрессировать те или иные маркеры эндотелиальных клеток. Так, культура EA.hy926 стабильно экспрессирует фактор фон Виллебранда и ICAM-1 при активации цитокином, но совершенно не способна экспрессировать E-селектин [133]. В случае, когда объектом исследования является одиночный белковый маркер эндотелия, вполне оправдано использование трансфицированных опухолевых культур (например, в работе [126]). Однако наиболее близкой к природе моделью эндотелия остаются первичные культуры, в первую очередь HUVEC — эндотелиальные клетки человека, выделенные из пупочной вены. Они выдерживают достаточное время жизни в культуре (до 10 пассажей). Сравнение с гликокаликсом эндотелиальных клеток пупочной вены человека, полученных *ex vivo*, показало, что HUVEC уступает по толщине и развитости гликокаликса — около 120 нм против 880 нм — но полностью соответствует по составу основных компонентов [134].

В настоящей работе в качестве модели эндотелия сосудов крови была выбрана первичная культура клеток от индивидуальных доноров HUVEC. Эксперименты проводились на четырехдневных культурах первого пассажа, что гарантирует сохранение всех характеристик нормального эндотелия сосудов крови человека с учетом различий в функциональной активности при переходе к разным донорам [135]. Для перехода к модели эндотелия в очагах воспаления и опухоли, клетки HUVEC активировались с помощью фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α).

Мы подобрали оптимальную концентрацию цитокина-активатора (ФНО- α) на основании данных по экспрессии E-селектина при обработке клеток различными концентрациями ФНО- α (от 0,1 нг/мл до 50 нг/мл). Поскольку в работе были использованы первичные культуры клеток от индивидуальных доноров HUVEC, можно было ожидать различные отклики на стимуляцию цитокином. В очень редких случаях и без обработки ФНО- α наблюдалась экспрессия E-селектина, что может свидетельствовать о наличии каких-либо воспалительных процессов у донора. В таком случае клетки исключались из дальнейших экспериментов. В норме, на контрольных клетках (без активации) E-селектины обнаружены не были, но появлялись в ответ на активацию ФНО- α , причем пропорционально увеличению концентрации цитокина (Рис. 7А). Оказалось, что значительное количество E-селектина обнаруживается уже при минимальной концентрации ФНО- α , а максимум достигается при концентрациях выше 1 нг/мл. В дальнейших экспериментах применяли концентрацию ФНО- α 50 нг/мл, поскольку еще большая концентрация цитокина не привела бы к значительному увеличению экспрессии E-селектина, но могла бы оказаться токсичной для клеток. При всех исследованных концентрациях ФНО- α

большая часть клеток активировалась, однако даже при максимальной концентрации цитокина обнаруживалась популяция неактивированных клеток (около 15% от общего числа клеток; **Рис. 7; Б**). По данным конфокальной микроскопии, E-селектин равномерно распределялся на поверхности активированных клеток (**Рис. 7; В**).

3.1.3. Накопление липосом клетками HUVEC

В качестве адресной системы доставки противоопухолевого средства (в данном случае — липофильного пролекарства мелфалана) к активированным эндотелиальным клеткам были исследованы липосомы, несущие SiaLe^x-лиганд (**SiaLe^x-липосомы**). В частности, была исследована зависимость связывания SiaLe^x-липосом с клетками от содержания этого лиганда в мембране липосом. Мы использовали преимущество метода проточной цитометрии — возможность анализировать ту популяцию клеток, которая наиболее активно взаимодействует с липосомами и имеет более высокий сигнал флуоресценции.

Вклад SiaLe^x-лиганда во взаимодействие липосом с активированными клетками оценивали по относительной avidности связывания: сначала инкубацию клеток с липосомами проводили в условиях блокировки эндоцитоза (при 4°C), затем удаляли несвязавшиеся липосомы и продолжали инкубацию клеток при 37°C (в условиях, позволяющих эндоцитоз), обеспечивая поглощение связанных с поверхностью клеток липосом. При такой постановке эксперимента есть возможность свести к минимуму неспецифические взаимодействия (например, слияние липосом с клеточной мембраной).

Неактивированные клетки связывали SiaLe^x-липосомы лишь незначительно, причем вне зависимости от содержания в них SiaLe^x-лиганда: липосомы, содержащие от 2 до 10 % мол. SiaLe^x имели практически одинаковый низкий уровень сигнала (**Рис. 8; А**). После активации клеток накопление SiaLe^x-липосом существенно возросло, а накопление липосом без лиганда осталось на том же низком уровне. В случае активированных клеток и SiaLe^x-липосом, при анализе методом проточной цитометрии на гистограммах появлялась отдельная популяция клеток с высоким сигналом флуоресценции — свидетельство специфического взаимодействия (**Рис. 8; Б**). Включение 2% мол. SiaLe^x в состав липосом привело к четырехкратному увеличению накопления активированными клетками по сравнению с неактивированными, а при содержании SiaLe^x 10% накопление увеличилось в 14 раз (**Рис. 8; А**).

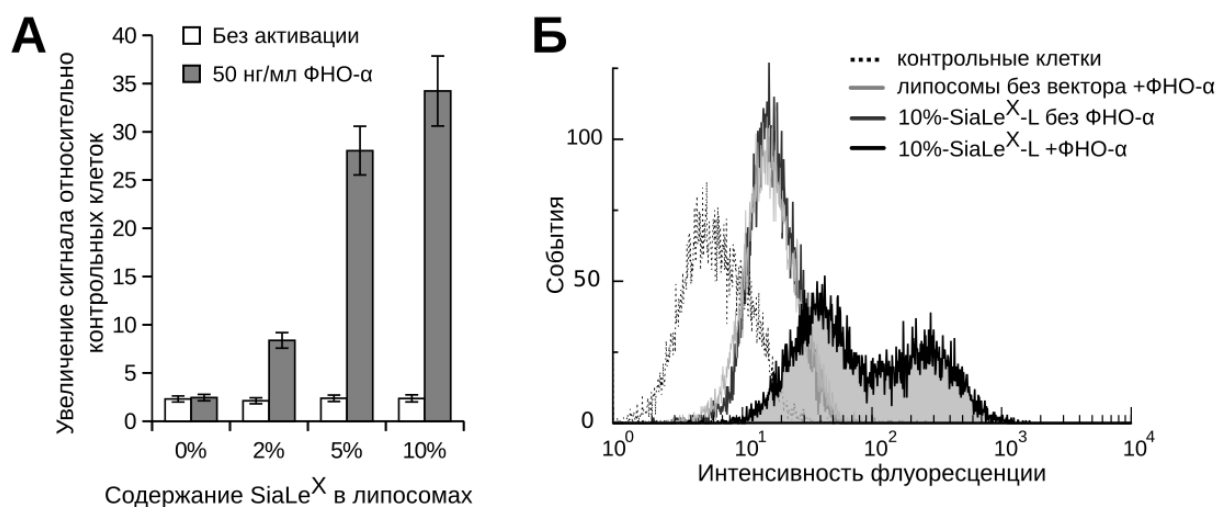


Рисунок 8: Авидность липосом. **А.** Нормальные или активированные (50 нг/мл ФНО-α) HUVEC инкубировали 1 час на льду с липосомами несущими 0, 2, 5 или 10% мол. SiaLe^X (50 мкМ суммарные липиды), промывали и инкубировали в питательной среде 1 час при 37°C; затем клетки суспендировали раствором EDTA и анализировали на проточном цитометре. Данные типичного эксперимента, приведены средние значения ± SE измерений. **Б.** Пример гистограмм окраски клеток после инкубации с липосомами: можно выделить популяцию с более яркой окраской, которая отвечает специфическим взаимодействиям между E-селектином и векторными липосомами.

В условиях без блокировки эндоцитоза (37°C) увеличение содержания SiaLe^X в липосомах оказало аналогичное влияние на взаимодействие с клетками HUVEC: шестикратное увеличение накопления 10%-SiaLe^X-липосом в случае активированных клеток и постоянный низкий уровень накопления в неактивированных клетках (**Рис. 9; А**). Как и следовало ожидать, при физиологических условиях вклад неспецифических взаимодействий оказался значительно выше. Например, при 37°C клетки без активации поглощали в 10 раз больше липосом, чем при 4°C вне зависимости от наличия вектора (при нормировании сигнала на аутофлуоресценцию необработанных клеток, после инкубации с липосомами при 4—37°C он возрастает в 2-3 раза, (**Рис. 8; А**), а при 37°C — в 20-25 раз (**Рис. 9; А**)). Кроме блокировки эндоцитоза уменьшение накопления липосом при пониженной температуре может быть обусловлено следующими факторами. При понижении температуры замедляется диффузия липидов в мембранах, то есть латеральная диффузия SiaLe^X-конъюгата в мембране замедлена, следовательно затрудняются множественные взаимодействия с рецепторами. Число доступных для связывания молекул E-селектина ограничено, т. к. процесс презентации новых рецепторов на поверхности клетки заблокирован. Константа авидности уменьшается при понижении температуры, следовательно большее число липосом может десорбироваться или смываться с поверхности клетки.

липосом даже в условиях инкубации при 4°C: снижение накопления всего на 40% по сравнению с контролем (при 37°C) [72]. Предположительно, это обусловлено слиянием липосом с мембраной эндотелиальных клеток за счет присутствия в составе липосом фьюзогенного липида диолеоилфосфатидилэтаноламина, причем опухолевые клетки эпителиального происхождения (COS-7) в тех же условиях практически не связывали липосомы (накопление уменьшалось на 90% по сравнению с контролем).

Полученные нами данные о накоплении липосом активированными клетками HUVEC свидетельствуют в пользу высокой селективности SiaLe^X-липосом, сопоставимой с иммунолипосомами. Так, пегилированные катионные липосомы для доставки siRNA, несущие полноразмерные моноклональные антитела к E-селектину в матрице из POPC/Chol [136], за 4 ч инкубации селективно накапливались активированными клетками HUVEC (в 10 раз больше, чем контрольными клетками) и обнаруживались в лизосомах. Ингибирование экспрессии целевого белка достигало 50%, что свидетельствует о способности липосом избежать лизосомальной деградации, хотя бы частично, и высвободить siRNA в цитоплазму. Также успешно реализована селективная доставка ДНК в составе иммунолипосом к активированным HUVEC [137]. Как уже отмечалось в начале раздела 3.1, для нацеливания на эндотелиальные клетки важно обеспечить множественные контакты с адгезионными рецепторами. Показано, что иммунолипосомы, сформированные из легкоплавких липидов ($T_m = -20^\circ\text{C}$), в два раза лучше накапливаются эндотелиальными клетками, чем липосомы из тугоплавких липидов ($T_m = 42^\circ\text{C}$). Очевидно, такой результат обусловлен формированием кластеров антител на поверхности липосом за счет латеральной диффузии и реализацией поливалентных взаимодействий с рецепторами на поверхности эндотелиальных клеток [121]. Матрица SiaLe^X-липосом также была сформирована из смеси природных фосфолипидов, создающих жидкофазный бислои.

По данным конфокальной микроскопии, клетки без активации для всех типов липосом показали диффузную окраску (Рис. 9Б). В случае активированных клеток, SiaLe^X-липосомы локализовались в цитоплазме как яркие отдельные точки и скопления, в то время как липосомы без лиганда сохранили диффузную окраску клетки. Эти результаты согласуются с данными проточной цитометрии, свидетельствуют о селективности действия SiaLe^X-липосом на активированные эндотелиальные клетки и подтверждают увеличение накопления липосом в зависимости от содержания в них SiaLe^X-лиганда.

Для доказательства наличия специфических взаимодействий между SiaLe^X-липосомами и E-селектином на поверхности активированных клеток мы провели эксперименты по конкурентному ингибированию с моноклональными антителами к E-селектину. Предварительная обработка активированных клеток избытком антител снижает накопление

10%-SiaLe^X-липосом на 70%, то есть практически до уровня накопления липосом без SiaLe^X (Рис. 10; А). При обработке неспецифическим IgG в качестве контроля такого эффекта не наблюдалось. Для оценки специфичности с помощью конфокальной микроскопии использовали 2%-SiaLe^X-липосомы, а также инкубацию при пониженной температуре, с целью уменьшения неспецифического связывания. Действительно, в присутствии избытка антител яркая точечная окраска SiaLe^X-липосом по контуру мембраны клетки исчезает и переходит в слабую диффузную окраску, характерную для липосом без вектора (Рис. 9; Б).

Таким образом, включение SiaLe^X-конъюгата в состав противоопухолевых липосом обеспечивает специфическое связывание с активированными эндотелиальными клетками. Неактивированные клетки лишь незначительно связывают SiaLe^X-липосомы.

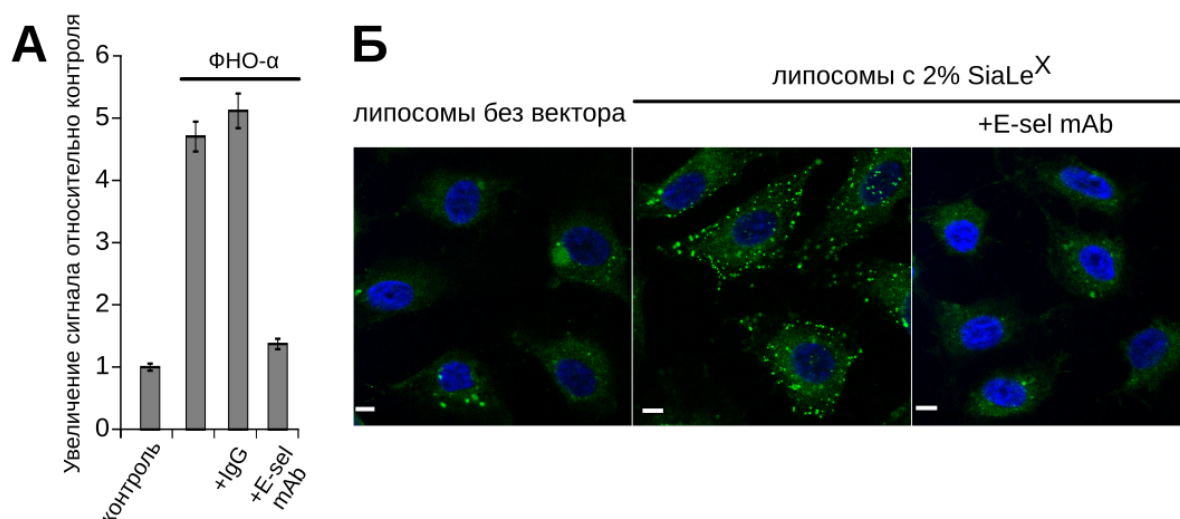


Рисунок 10: Специфичность связывания SiaLe^X липосом с клетками HUVEC. Активированные (50 нг/мл ФНО-α) или нормальные клетки были прединкубированы с избытком антител к E-селектину (10 мг/мл, 1 ч при 37°C) или неспецифическими IgG в качестве контроля и затем обработаны суспензией липосом, содержащих BODIPY-PC (зеленая флуоресценция). **А.** Клетки инкубировали с 10%-SiaLe^X липосомами (50 мкМ суммарные липиды, 1 ч при 37°C), промывали, суспендировали раствором EDTA и анализировали на проточном цитометре. **Б.** Активированные клетки до добавления липосом обрабатывали Ab и затем инкубировали с липосомами без вектора или с 2%-SiaLe^X-липосомами (25 мкМ суммарные липиды, 1 ч при 4°C). Ядра клеток окрашены синим, липосомы зеленым. Масштабная линейка 5 мкм.

3.1.4. Оценка количества интернализированных и связанных с клеточной мембраной липосом

Для оценки количества липосом, связанных с цитоплазматической мембраной и интернализированных клеткой, была использована флуоресцентная спектроскопия согласно методу, описанному в работе Ли и соавт. [138]. Фракция липосом, связанных с цитоплазматической мембраной, может быть выделена путем длительной обработки трипсином (30 мин при 37°C, вместо 1-3 мин, необходимых для открепления клеток от культурального пластика). Такая обработка приводит к сбрасыванию гликокаликса и диссоциации липосом с поверхностью клеток. После центрифугирования в супернатанте остается фракция липосом, связанных с мембраной, а в осадке — клетки с интернализированными липосомами. Полученные образцы обрабатываются детергентом, после чего детектируется флуоресцентный сигнал. В отличие от проточной цитометрии, данный метод позволяет оценить интегральную интенсивность флуоресценции в образце, без возможности выделения отдельных субпопуляций клеток. Чувствительность детектирования сигнала при этом существенно ниже, чем для проточной цитометрии, поэтому мы были вынуждены повысить концентрацию липосом в 60 раз. Безусловно, такое увеличение концентрации повышает долю неспецифических взаимодействий, что отчасти нивелирует высокоаффинные поливалентные взаимодействия между SiaLe^x-лигандом и E-селектином.

Тем не менее, с помощью флуоресцентной спектроскопии удалось показать, что оба процесса — связывание и интернализация липосом активированными клетками — осуществляются на 40-50% эффективнее в случае SiaLe^x-липосом по сравнению с липосомами без вектора (**Рис. 11**). Интересно, что отношение количества связанных к интернализированным липосомам для всех четырех вариантов эксперимента (липосомы с/без SiaLe^x, клетки с/без активации) было близко к двум, то есть только половина связанных с мембраной клеток липосом проникает внутрь ее. Это согласуется с результатами Кесснера и соавт., которые использовали для липосом, несущих N-(7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил)-метку, метод тушения флуоресценции дитионитом [139]. Клетки далее инкубировали с липосомами при 4°C, а затем при 37°C. Вне зависимости от наличия и специфичности антител, лишь 20-25% связанных 70-нм-липосом, несущих анти-E-селектин моноклональные антитела или неспецифические IgG (расположенные различными способами в мембране липосом), интернализировались активированными HUVEC. За 90 мин инкубации при 37°C активированные клетки поглощали около 3100 липосом на клетку.

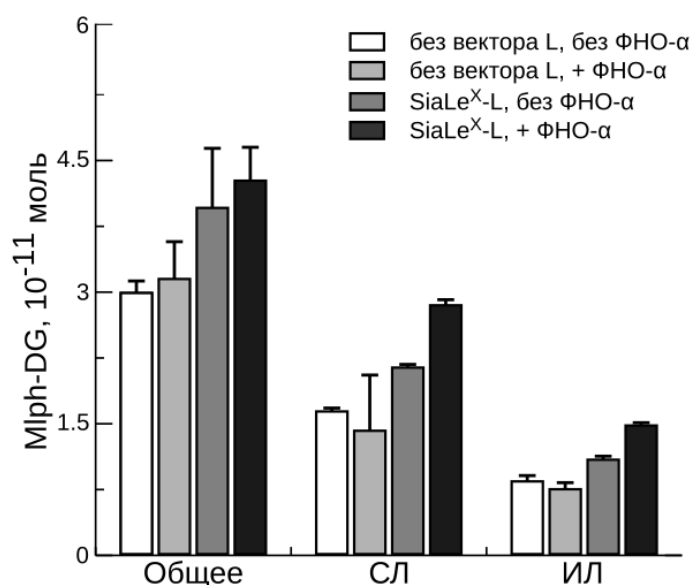


Рисунок 11: Спектрофлуориметрия клеточных лизатов. Липосомы (3 мМ суммарные липиды, 2% BODIPY-PC, 2% SiaLe^X-конъюгата) инкубировали с клетками HUVEC в течение 1 час при 37°C. Далее клетки промывали PBS и обрабатывали раствором трипсин/EDTA в течение 1 или 30 минут при 37°C. Клетки после кратковременной обработки солюбилизировали 0,5% Triton X-100 и обрабатывали на УЗ-бане 30 минут; данная фракция представляет собой общее накопление липосом клетками (Общее). Клетки после длительной обработки трипсином разделяли центрифугированием с последующей солюбилизацией осадка (ИЛ, интернализированные липосомы) и супернатанта (СЛ, связанные с мембраной клеток липосомы). Сигнал BODIPY-PC представлен как количество вещества пролекарства по калибровочной кривой. Среднее \pm SD для двух независимых экспериментов.

Несмотря на все различия флуоресцентной спектроскопии и проточной цитометрии, для 2%-SiaLe^X-липосом оба метода показали увеличение общего накопления активированными клетками на 35%, по сравнению с липосомами без вектора (**Рис. 11** и **Рис. 9; А**).

Важно, что с помощью спектрофлуориметрии стало возможным получить количественные (в молях) данные о накоплении липосом. Исходя из измеренного спектрофотометрически количества Mph-DG в образцах клеточных лизатов ($4 \cdot 10^{-11}$ моль, **Рис. 11**, столбец «Общее»), теоретического числа молекул пролекарства на одну липосому (~ 8000 молекул для липосомы размером 100 нм) и числа клеток в лизате (около $2 \cdot 10^5$ клеток), можно вычислить количество липосом, связанных и поглощенных с клеткой. Оказалось, что при избытке липосом в среде активированные клетки HUVEC накапливают около 15 000 SiaLe^X-липосом на одну клетку за один час инкубации.

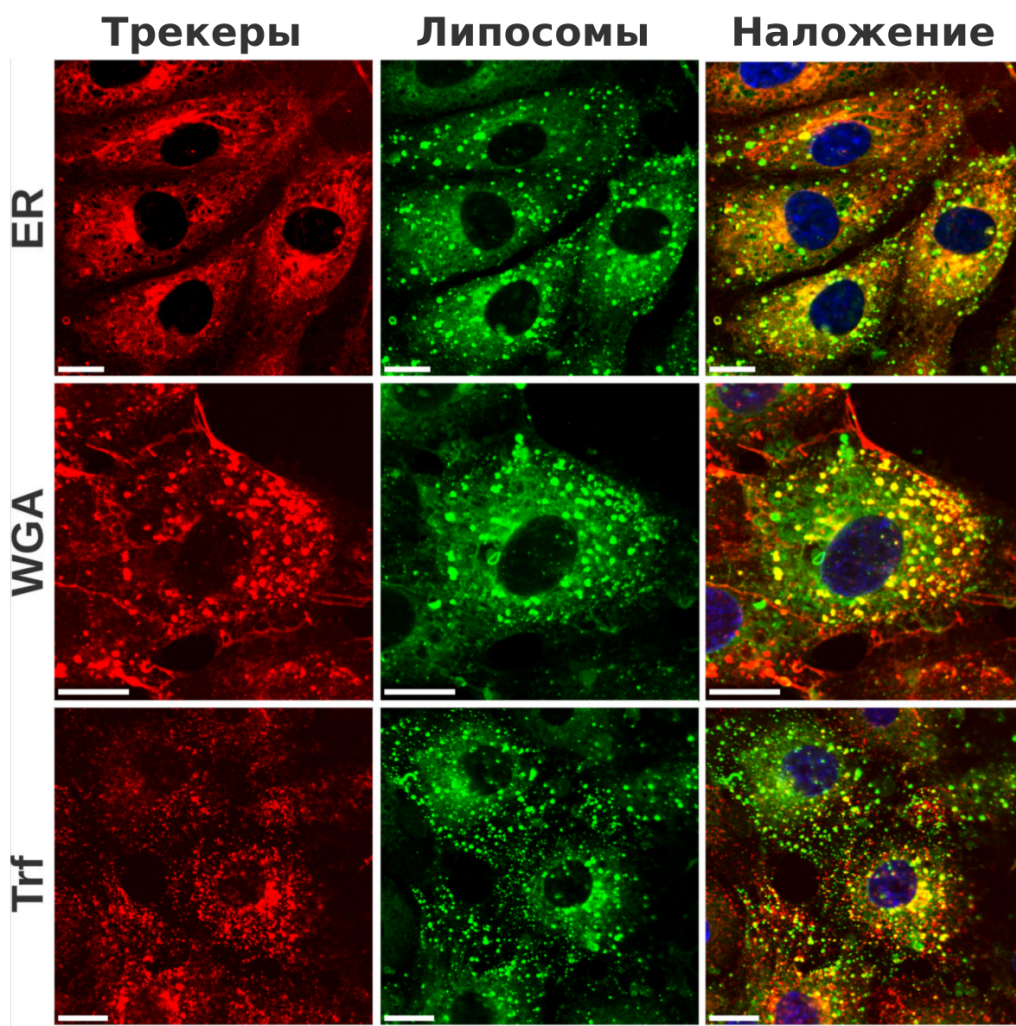


Рисунок 12: Внутриклеточное распределение $SiaLe^x$ -липосом в активированных эндотелиальных клетках. Бислой липосом содержит BODIPY-PC (зеленый). Колокализация с трекерами эндоплазматического ретикулума (ER), гликокаликса и аппарата Гольджи (WGA, wheat germ agglutinin) (красный). Ядра активированных (50 нг/мл ФНО- α) клеток HUVEC предварительно были окрашены Hoechst (синий), затем клетки совместно инкубировали с 5% $SiaLe^x$ -липосомами (50 мкМ суммарные липиды) и трекерами в течение 15 мин при 37°C. Затем клетки фиксировали 1% PFA (15 мин, 37°C) и анализировали на конфокальном микроскопе.

3.1.5. Внутриклеточное распределение липосом

Проследить за ранними стадиями внутриклеточного распределения липосом в активированных клетках HUVEC нам удалось с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии и трекеров органелл. Липосомы с BODIPY-меткой в бислое детектировали в зеленом канале, а все трекеры были подобраны для красного канала конфокального микроскопа. Внешние границы клетки и гликокаликс визуализировали с помощью трекера WGA (агглютинин из ростков пшеницы), внутриклеточное пространство окрашивали трекерами ЭПР

(конъюгат глибенкламида и BODIPY-TR) и ранних эндосом (трансферрин, интернализуемый путем клатрин-зависимого эндоцитоза с образованием ранних эндосом). Уже через 15 мин инкубации липосомы обнаруживались внутри клетки — трекер WGA четко окрашивает внешнюю границу клетки и гликокаликса, оставляя зеленый сигнал липосом внутри клетки. Диффузная зеленая окраска липосом практически полностью лежит в области ЭПР, а яркие скопления липосом частично перекрываются с треком ранних эндосом (**Рис. 12**).

Важно, что колокализация с трансферрином отражает эндоцитоз по классическому клатрин-зависимому пути (рецепторы трансферрина находятся в клатрин-окаймленных ямках) и можно заметить, что совпадения со скоплениями липосом лишь частичны. Это позволяет предположить, что наличие SiaLe^x в липосомах дает им дополнительный, клатрин-независимый путь эндоцитоза. В литературе есть данные о кластеризации E-селектина в липидных рафтах и клатрин-окаймленных ямках плазматической мембраны эндотелиальных клеток (хотя его интернализация происходит через клатриновые везикулы) [140]. Кроме того, в работе Асмута и соавт. [110] показано с помощью электронной микроскопии криосрезов ФНО- α активированных HUVEC после иммуноокрашивания E-селектина коллоидным золотом, что число клатриновых везикул и клатрин-окаймленных ямок гораздо меньше, чем количество E-селектина внутри клетки т. е. клатрин-зависимый эндоцитоз — не единственный путь интернализации E-селектина. В целом, вероятнее всего предположить, что после попадания в эндосомы (тем или иным путем) SiaLe^x-липосомы проходят сортировку в аппарате Гольджи после чего направляются в ЭПР — такое развитие событий описано как для клатрин-зависимого эндоцитоза, так и для жидкофазного мембранного захвата [141].

Для липосом без вектора ярких скоплений внутри клетки не наблюдалось, вся окраска была диффузной и равномерно распределялась в области ЭПР (см. **Рис. 10; Б**). Причем с увеличением времени инкубации (15, 30, 90 мин) характер окрашивания не менялся, а только становился более интенсивным (более ярким). Диффузная окраска характерна скорее для неспецифических путей проникновения липосом в клетку — путем слияния мембран, липидного обмена и т. п. (т. е. без образования транспортных везикул).

Таким образом, можно предполагать следующую картину ранних стадий интернализации SiaLe^x-липосом активированными эндотелиальными клетками: связывание липосомы с E-селектином, эндоцитоз, распределение и транспорт липосом в составе эндосом к аппарату Гольджи и затем к эндоплазматическому ретикулуму, где липосомы разгружаются, то есть липиды встраиваются в структуру ЭПР, а пролекарство становится доступно для внутриклеточных ферментов. Процесс внутриклеточной разгрузки липосом был изучен нами более детально с использованием липосом с двумя флуоресцентными метками.

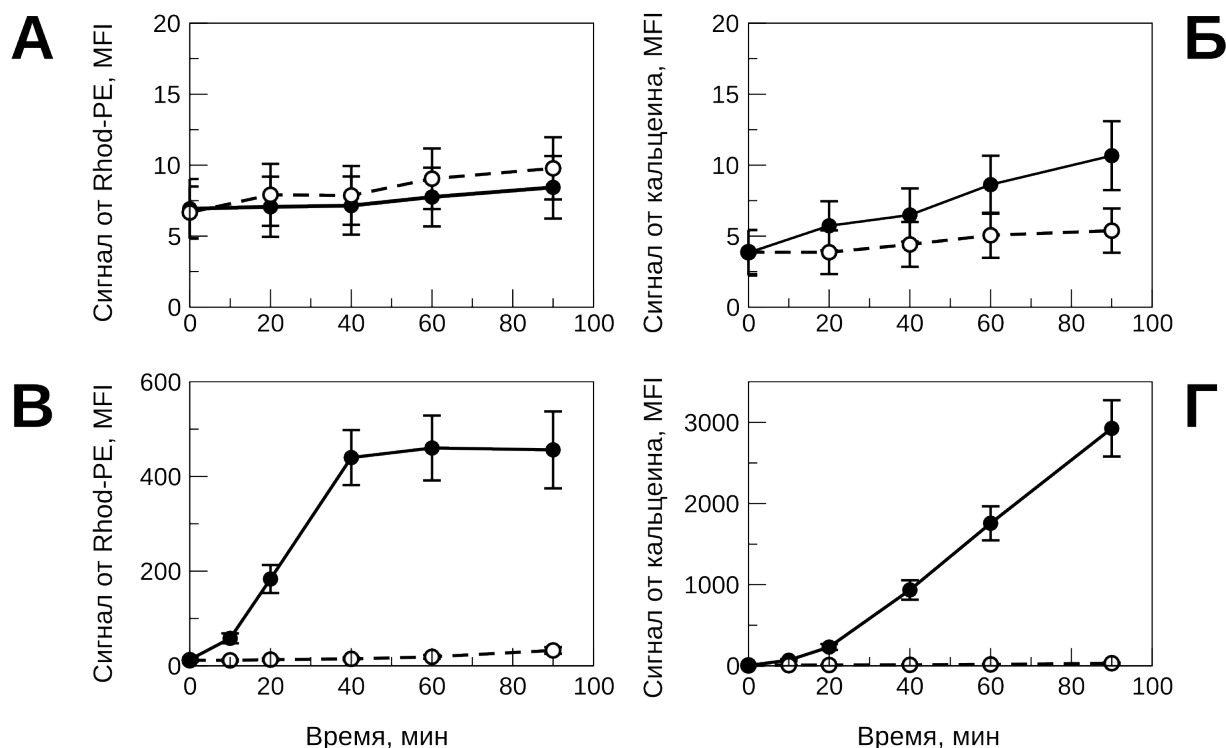


Рисунок 13: Динамика связывания (сигнал Rhod-PE) и внутриклеточной разгрузки (сигнал кальцеина) липосом с 5% SiaLe^x (50 мкМ, суммарные липиды) при инкубации с нормальными (**А** и **Б**) или активированными (**В** и **Г**) эндотелиальными клетками HUVEC при 37°C (сплошная линия) или при 4°C (пунктир). Мембрана липосом содержит Rhod-PE, а во внутренний водный объем заключен кальцеин в концентрации самотушения. При 37°C активированные HUVEC активно связывают липосомы, причем через 40 мин наступает насыщение, связывание сопровождается быстрой (минуты) интернализацией с нарушением целостности липосом. При низкой температуре связывание было существенно ниже и липосомы сохраняли свою целостность. Данные проточной цитометрии, репрезентативный эксперимент, приведены средние значения ± SE измерений.

3.1.6. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом

Для того, чтобы отследить связывание, интернализацию и внутриклеточную разгрузку SiaLe^x-липосом в клетках HUVEC, была использована проточная цитометрия и липосомы с двумя флуоресцентными метками, как описано в работе [142]. Мы приготовили липосомы с 5% SiaLe^x-конъюгата, несущие в бислое родамин-меченый липид (Rhod-PE), а во внутреннем водном объеме — кальцеин в высокой концентрации (самотушен). Сигнал флуоресценции родамина отражает общее накопление липосом клеткой, а сигнал кальцеина позволяет отследить процесс разрушения липосом, поскольку при нарушении целостности бислоя кальцеин вытекает во внешнюю среду, разбавляется и сигнал его флуоресценции растет. Клетки

без активации показали очень низкий уровень накопления липосом вне зависимости от наличия SiaLe^x-лиганда за все время наблюдения (1.5 ч); сигнал кальцеина также был очень низкий и оставался на одном уровне в течение всего эксперимента (Рис. 13; А,Б). Совершенно другая картина наблюдалась для активированных клеток: интенсивное накопление липосом за первые 40 мин с последующим насыщением, причем накопление сопровождалось быстрым (минуты) разрушением липосом, без выхода на плато (Рис. 13; В,Г).

Данные конфокальной микроскопии согласуются с этими результатами (Рис. 14). На изображениях в начальный момент времени липосомы адсорбированы на поверхности клетки и выглядят как мелкие красные точки, которые затем, через 40 и 90 мин, перемещаются ближе к ядру, превращаясь в более крупные зеленые и желтые пятна (желтый цвет соответствует наложению красного и зеленого сигналов).

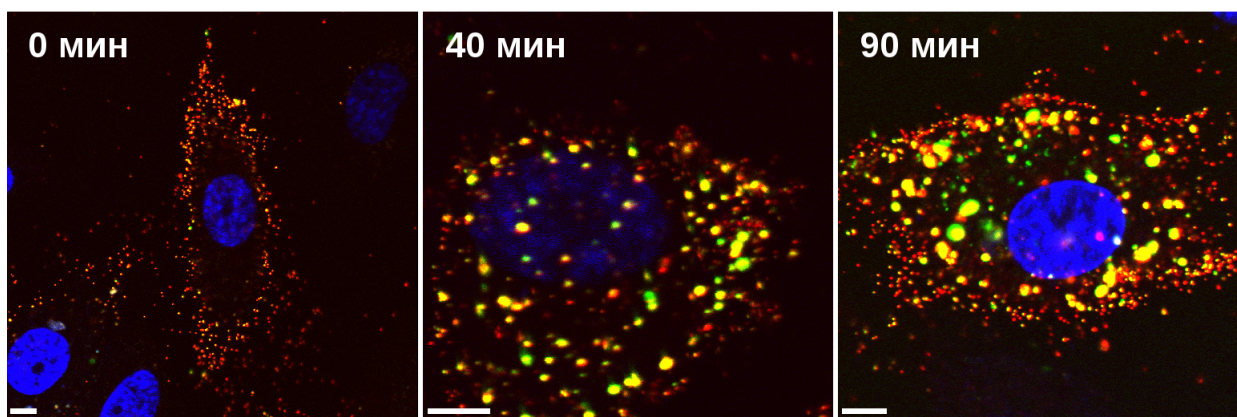


Рисунок 14: Конфокальная микроскопия интернализации векторных липосом активированными клетками HUVEC. Мембрана липосом содержит Rhod-PE (красный), а во внутренний водный объем заключен кальцеин (зеленый) в концентрации самотушения; ядра клеток окрашены Hoechst (синий). Перед экспериментом клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (5% SiaLe^x 50 мкМ) в течение 30 мин на льду, затем клетки промывали и инкубировали указанное время при 37°C в полной ростовой среде. Масштабная линейка 5 мкм.

Таким образом, используя липосомы с двумя флуоресцентными метками и проточную цитометрию, мы показали, что SiaLe^x-липосомы претерпевают быструю интернализацию активированными клетками HUVEC, и этот процесс сопровождается разрушением липосом, которое начинается сразу же после захвата клеткой и продолжается все 1.5 ч наблюдения. Этот процесс визуализирован с помощью конфокальной микроскопии.

Ранее [123,139] с помощью pH-чувствительной пираниновой метки было показано, что иммунолипосомы различного состава, нацеленные на E-селектин, интернализуются, по крайней мере отчасти, по эндосомально/лизосомальному пути и детектируются в кислых везикулярных

компартаментах через 2-4 ч после связывания с клеткой. В то же время, по данным флуоресцентной микроскопии, липосомы также сливаются с мембраной клетки и высвобождают свое содержимое в цитоплазму за 1.5 ч инкубации. Другой коллектив авторов [131] показал, что SiaLe^x-липосомы из яичного фосфатидилхолина, нагруженные антисмысловыми олигонуклеотидами, понижают экспрессию белка в активированных клетках HUVEC, при этом уровень экспрессии мРНК остается неизменным, следовательно содержимое липосом высвобождается в цитоплазме, где и происходит гибридизация с целевой мРНК. В нашем случае можно предположить, что мембрана SiaLe^x-липосом сливается с мембраной эндосомальных компартментов на самых ранних стадиях и затем переносится к ЭПР, поскольку наибольшую колокализацию мы наблюдали именно с этой органеллой. Тогда наши липосомы с большой долей вероятности могут избежать деградации в лизосомах и достаточно долго могут быть доступными для действия эстераз, высвобождающих лекарство (мелфалан), которое затем попадает в ядро и реализует специфический цитотоксический эффект за счет алкилирования и образования межцепочечных и внутрицепочечных сшивок ДНК. Это предположение подтверждается проведенными ранее в лаборатории химии липидов ИБХ РАН экспериментами *in vivo* на модели рака легких мыши. Так, лечение 2%-SiaLe^x-липосомами с M₁ph-DG дало антивазкулярный эффект за счет апоптоза эндотелиальных клеток и последующее торможение роста опухоли [8]. Другой возможный вариант: SiaLe^x-липосомы проникают в клетку по кавеолин-зависимому пути и сливаются с транспортными везикулами. В таком случае липофильное пролекарство может транспортироваться к противоположенной стороне клетки, минуя эндосомальные компартменты (явление трансцитоза характерно для эндотелиальных клеток [143]), и высвобождаться непосредственно для взаимодействия с опухолевыми клетками.

Важно, что, в отличие от активированных клеток, неактивированные клетки HUVEC поглощают лишь незначительное количество липосом за все время наблюдения (1.5 ч) вне зависимости от наличия в них лиганда. Это обстоятельство свидетельствует о возможном высоком терапевтическом потенциале и селективности действия SiaLe^x-липосом с пролекарством мелфалана после внутривенного введения именно на воспаленный эндотелий микроокружения опухоли.

3.2. Изучение механизма взаимодействия с опухолевыми клетками липосом, нагруженные липофильным пролекарством метотрексата

Метотрексат (МТХ) — цитостатический препарат из группы антиметаболитов, антагонистов фолиевой кислоты, широко применяемый для лечения солидных опухолей, гематологических злокачественных заболеваний и аутоиммунных патологий. Метотрексат оказывает выраженное иммуносупрессивное действие даже в относительно низких дозах, не обладающих заметной гематологической токсичностью. Механизм действия метотрексата связан с ингибированием синтеза пуриновых нуклеотидов и тимидилата в результате необратимого связывания с дигидрофолатредуктазой, что препятствует восстановлению дигидрофолата в активный тетрагидрофолат. Благодаря этому МТХ более активен в отношении быстро растущих клеток. Однако эффективность лечения МТХ ограничивается системной токсичностью и частым развитием лекарственной устойчивости, связанной, главным образом, с мутациями и понижением активности белка-транспортера восстановленного фолата (reduced-folate carrier, RFC) и аналогов-антифолатов. RFC представляет собой анионный белок-переносчик, осуществляющий трансмембранный перенос восстановленных фолатов — 5-метилтетрагидрофолата и МТХ, — которые затем подвергаются полиглутаминированию [144].

Механизм проникновения свободного МТХ в опухолевые клетки достаточно хорошо изучен. Основной транспорт МТХ в клетку осуществляется через RFC, хотя аффинность к нему невысока. Кроме того, МТХ способен связываться с фолатным рецептором (ФР), хотя по сравнению с фолиевой кислотой или 5-метилтетрагидрофолиевой кислотой МТХ имеет на 2 порядка более низкое сродство к ФР [145,146]. Фолатный рецептор — N-гликозилированный белок массой 38-40 кДа, который у человека представлен тремя изоформами — α , β , и γ/γ' . ФР- α и ФР- β — это мембранные белки с гликозилфосфатидилинозитным якорем, а ФР- γ/γ' не имеет мембранного якоря и существует в секретируемой форме. Все изоформы ФР обладают ~70% гомологией аминокислотных последовательностей и высокой аффинностью к фолиевой кислоте ($K_d \sim 0.1$ нМ для ФР- α , ~ 1 нМ для ФР- β и ~ 0.4 нМ для ФР- γ). Распределение ФР в тканях активно изучалось в 90-е годы с помощью различных методов, в том числе иммуногистохимического окрашивания, вестерн-блоттинга, связывания ^3H -ФК и др. [147]. В нормальных тканях ФР- α не обнаруживается, за исключением плаценты, почек (проксимальные канальцы), фаллопиевых труб и сосудистых сплетений. Однако, экспрессия ФР в этих тканях ограничивается люминальной поверхностью определенных эпителиальных клеток, которые не

имеют контакта с системным кровотоком. В случае злокачественных опухолей часто наблюдается повышенная экспрессия ФР- α , например, около 90% случаев при раке яичников и шейки матки; в меньшей степени — при раке легких, молочной железы, прямой кишки, мозга и почечного эпителия [148]. Экспрессия ФР- β в нормальных тканях ограничивается плацентой и гемопоэтическими клетками. Также эта изоформа ФР в норме играет важную роль в дифференцировке миеломоноцитарных клеток и в активации макрофагов и моноцитов. Примерно в 70% случаев острого миелоидного лейкоза и в большинстве случаев хронического миелоидного лейкоза бластные клетки экспрессируют ФР- β [149]. В связи с повышением экспрессии ФР- α и ФР- β при возникновении опухолей, оба рецептора считаются потенциальными маркерами, которые могут быть использованы в качестве мишеней для направленной доставки лекарств. В то же время RFC не может выступать в качестве мишени, поскольку этот рецептор представлен на всех клетках организма.

Классическим подходом для нацеливания наночастиц к ФР является использование непосредственно ФК для модификации поверхности НЧ [38,149,150]. Например, разработаны пегилированные липосомы, нагруженные доксорубицином и несущие конъюгат ФК с PEG₃₃₅₀-спейсером на поверхности, которые существенно замедляли рост опухоли и увеличивали продолжительность жизни животных по сравнению с липосомами без ФК-модификации [151].

Предположительно, метотрексат, как близкий аналог ФК, можно рассматривать в качестве бифункционального агента, сочетающего в себе цитостатическое и нацеливающее действие. О вовлеченности ФР- α в транспорт свободного МТХ свидетельствует тот факт, что МТХ оказался активен в отношении опухолевых клеточных линий с дефицитом RFC и повышенной экспрессией ФР- α (в условиях дефицита ФК в ростовой среде) [152]. Однако для клеток, экспрессирующих как RFC, так и ФР- α , действие МТХ осуществлялось с помощью транспорта именно через RFC. Кроме того, было показано что цитотоксическое действие МТХ на клетки KB, характеризующиеся высокой экспрессией ФР- α , не изменяется в зависимости от концентрации ФК в среде [145]. Фолиевая кислота в неизменном виде способна проникать в клетки через фолатные рецепторы, но физиологическая потребность в ФК для большинства клеток практически полностью удовлетворяется за счет восстановленных фолатов, которые транспортируются в клетку через RFC [149]. В целом, маловероятно, что клинические проявления действия свободного МТХ могут быть связаны с транспортом МТХ посредством ФР- α .

При модификации МТХ и включении его в состав наноразмерных носителей (супрамолекулярных систем) механизм проникновения в клетку может измениться. В работе Kohler и соавт. [153] магнитные НЧ с ковалентно пришитыми молекулами МТХ (частица

диаметром 10 нм несет около 400 молекул лекарства) более эффективно накапливались клетками рака молочной железы человека и рака яичников человека, чем клетками первичной культуры кардиомиоцитов крысы (нормальные клетки). Авторы связывают такой эффект с наличием именно ФР на опухолевых клетках. По данным электронной микроскопии срезов фиксированных клеток, после 24 ч инкубации НЧ накапливались преимущественно в лизосомах, что подразумевает классический эндосомально-лизосомальный путь распределения в клетке [153].

Еще один пример изменения механизма проникновения в клетку для системы доставки МТХ — поли(амидоамидные) дендримеры [154], которые, по мнению авторов, способны за счет поливалентных взаимодействий нацеливать конъюгированный с ними МТХ на опухолевые клетки с повышенной экспрессией ФР. Действительно, в условиях дефицита ФК в среде такие клетки связывали до 5 раз больше МТХ-дендримеров, по сравнению с ФР-отрицательными клетками. Более того, прединкубация клеток с 10-кратным избытком свободной ФК приводила к снижению накопления МТХ-дендримеров почти в 2 раза.

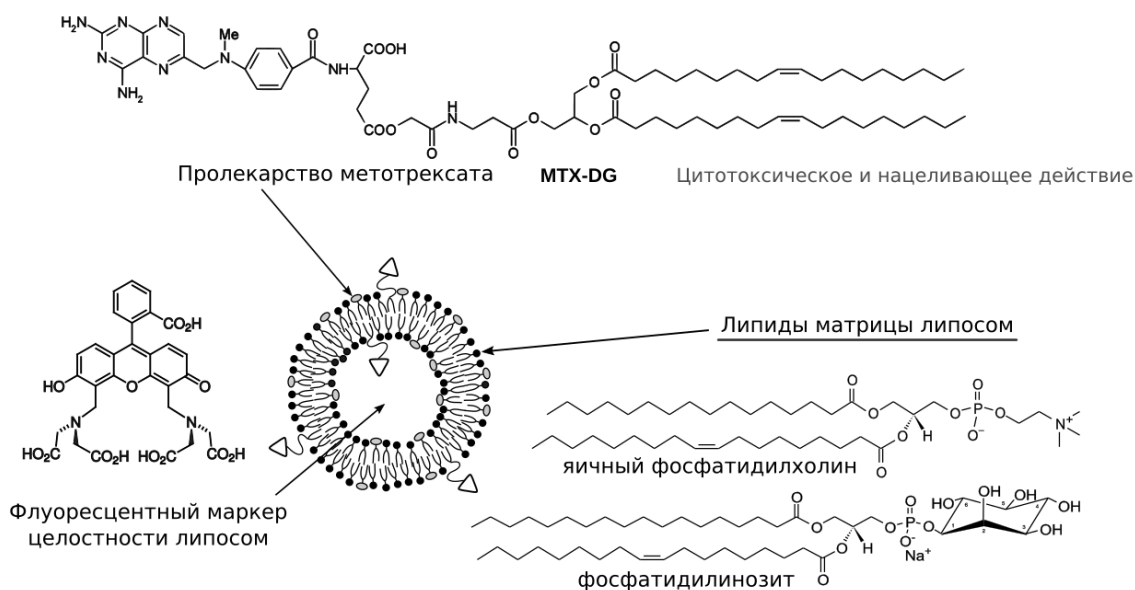
Первые работы по синтезу фосфолипидных производных МТХ появились в середине 80-х [155]. Липосомы, несущие амидный конъюгат МТХ с димиристоилфосфатидилэтаноламином (через γ -СООН метотрексата) в липидном бислое на основе диолеилфосфатидилэтаноламина, эффективно ингибировали дигидрофолатредуктазу и замедляли рост опухолевых клеток. Показано, что такие липосомы не используют транспортную систему клетки, ответственную за проникновение свободного МТХ. Интересно, что аналогичное производное МТХ, но без жирнокислотных остатков по механизму проникновения в клетку не отличается от свободного МТХ, то есть изменение механизма происходит именно при переходе к супрамолекулярной липосомальной системе.

Поиск подходов к повышению эффективности лечения метотрексатом ведется постоянно. За последние 10-20 лет было разработано множество разнообразных систем доставки МТХ и его производных [156–158], к сожалению, для большинства из них механизм проникновения в клетку не изучен.

Ранее в лаборатории химии липидов ИБХ РАН был синтезирован сложноэфирный конъюгат МТХ с *rac*-1,2-диолеилглицерином (МТХ-DG) [159] (Рис. 15). Для объемистой молекулы МТХ предусмотрен β -аланильный линкер, который в бислое находится в области полярных головок фосфолипидов, позволяя остаткам МТХ расположиться на поверхности липосом и обеспечивая тем самым встраивание пролекарства в бислой с меньшим нарушением его структуры. Сложноэфирная связь между лекарством и остальной частью молекулы способна легко

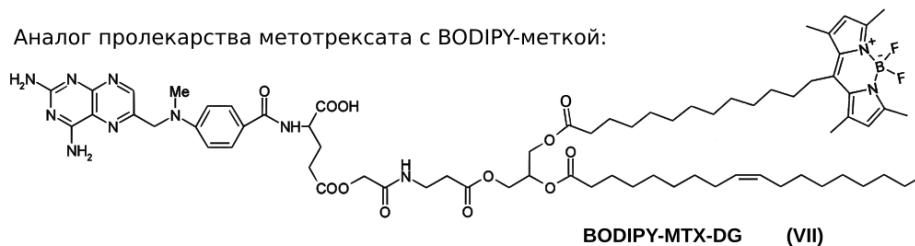
гидролизироваться внутриклеточными эстеразами ввиду их низкой субстратной специфичности. Была показана способность МТХ-DG в липосомальной форме преодолевать устойчивость опухолевых клеток к МТХ, обусловленную нарушением транспорта лекарства в клетку из-за пониженной функции RFC, белка-транспортера восстановленных фолатов [9]. Очевидно, это связано с изменением пути проникновения в клетку МТХ в составе липосом. В этой связи представляло интерес детально изучить механизмы проникновения липосом с МТХ-DG (МТХ-липосом) в опухолевые клетки.

Задачей данной части диссертационной работы было выяснение механизма взаимодействия с опухолевыми клетками МТХ-липосом и изучение внутриклеточного транспорта пролекарства метотрексата. Для решения поставленной задачи были намечены следующие этапы: (1) сравнение накопления МТХ-липосом клетками различных линий; (2) оценка вклада потенциальных рецепторов МТХ-липосом (ФР- α и RFC) в их накопление клетками; (3) изучение механизма проникновения МТХ-липосом в клетку с помощью ингибиторов эндоцитоза; (4) оценка параметров внутриклеточной разгрузки МТХ-липосом; (5) синтез флуоресцентного аналога МТХ-DG; (6) изучение внутриклеточного распределения МТХ-липосом и пролекарства метотрексата.

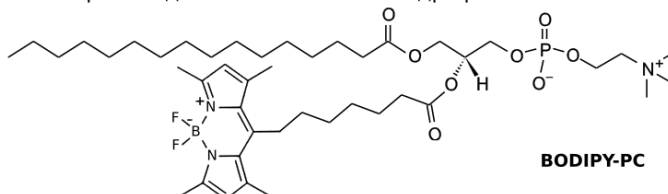


Флуоресцентные маркеры бислоя

Аналог пролекарства метотрексата с BODIPY-меткой:



Фосфолипид с BODIPY-меткой в гидрофобном хвосте:



Фосфолипид с родаминильной меткой в полярной голове:

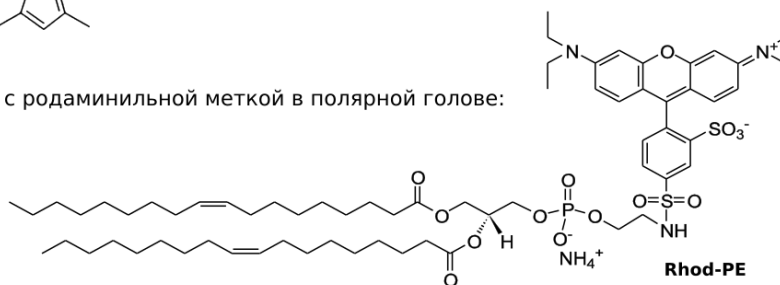


Рисунок 15: Молекулярные структуры компонентов липосом. Приведены репрезентативные структуры природных липидов матрицы липосом – яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита пекарских дрожжей – и формулы липофильного пролекарства метотрексата **MTX-DG**, его флуоресцентного аналога **BODIPY-MTX-DG**, флуоресцентных фосфолипидных зондов и кальцеина.

3.2.1. Объект исследования

Липосомы с липофильным пролекарством метотрексата MTX-DG (MTX-липосомы) на основе матрицы из яичного фосфатидилхолина (PC) и фосфатидилинозита (PI) из пекарских дрожжей *S. cerevisiae* (PC–PI–MTX-DG, 8:1:1, мол.) получали методом экструзии. В качестве контрольных липосом выступали пустые липосомы (без пролекарства). Молекулярные структуры компонентов липосом приведены на Рис. 15. Физико-химические характеристики липосом даны в Таблице 3. Дополнительно в бислой липосом включали BODIPY- или Rhod- меченые фосфолипиды (BODIPY-PC 0.5% мол., Rhod-PE 1% мол.) на стадии получения липидной пленки. Для отслеживания стабильности липосом, а также динамики их внутриклеточной разгрузки во внутренний водный объем был включен кальцеин (флуоресцентный маркер целостности липосом). Для мониторинга внутриклеточного транспорта пролекарства метотрексата в состав липосом вводили его флуоресцентный аналог — BODIPY-MTX-DG (1% мол.), — несущий BODIPY-метку при концевом метиле алифатической цепи.

Таблица 3. Физико-химические характеристики липосом^a

Наименование	Состав (мол.)	D (нм)	PDI	ζ- потенциал, mV
Контрольные липосомы	PC/PI, 9 : 1	92 ± 1	0.062	-42 ± 1
MTX-липосомы	PC/PI/MTX-DG, 8 : 1 : 1	99 ± 1	0.063	-53 ± 4

^a D - средний диаметр; PDI – индекс полидисперстности; приведены средние значения ± SE измерений.

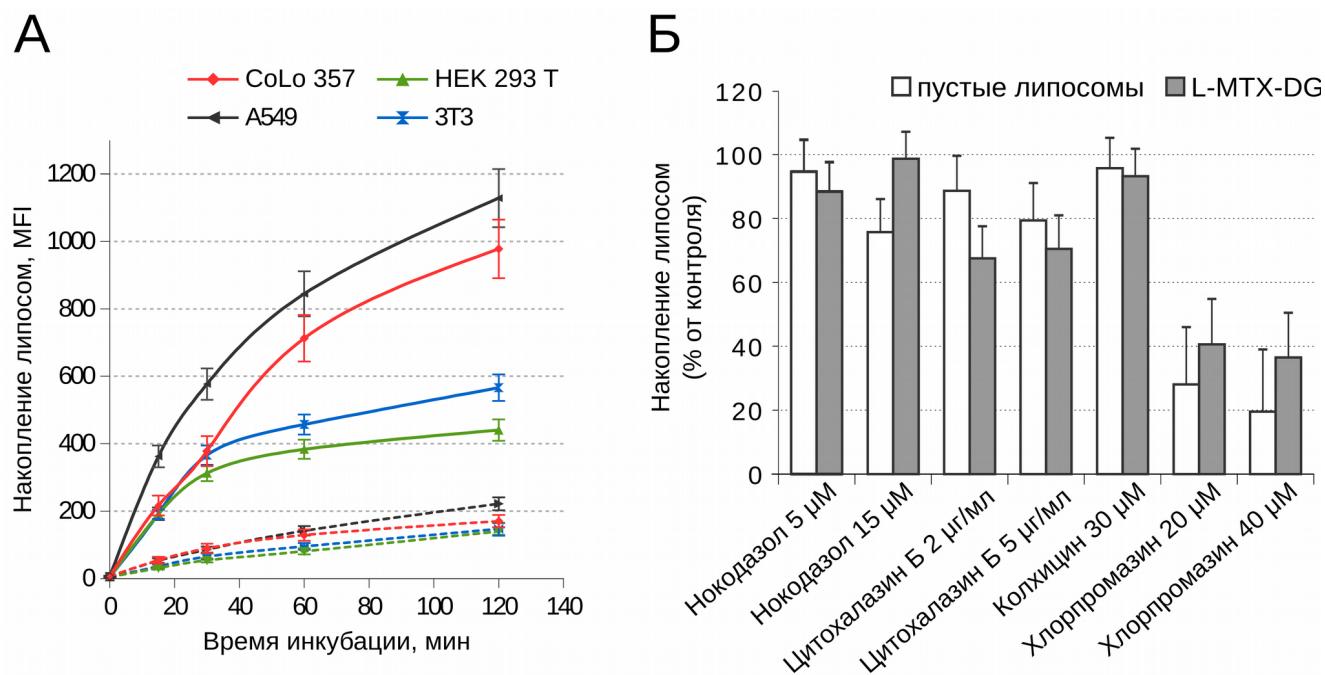


Рисунок 16: Накопление липосом опухолевыми клетками и определение механизма проникновения липосом в клетку. **А.** Связывание липосом несущих метку BODIPY-PC в бислое с опухолевыми (CoLo 357, A549) и нормальными (HEK 293T, 3T3) клетками. Клетки инкубировали с липосомами (100 мкМ суммарные липиды) при 37°C указанные промежутки времени, промывали PBS, суспендировали раствором EDTA и анализировали на проточном цитометре. Данные репрезентативного эксперимента, среднее \pm SE. Сплошная линия — липосомы нагруженные MTX-DG, пунктир — пустые липосомы. **Б.** Накопление липосом в присутствии ингибиторов эндоцитоза и везикулярного трафика на клетках A549. Перед добавлением липосом (100 мкМ, 1 ч, 37°C) клетки были обработаны ингибиторами (подробнее см. материалы и методы). Данные представлены относительно накопления липосом контрольными клетками (без ингибиторов, 100%). Данные репрезентативного эксперимента, приведены средние значения \pm SE измерений.

3.2.2 Накопление липосом опухолевыми клетками

Для оценки вклада MTX-DG в накопление липосом различными опухолевыми клетками — HeLa (клетки рака шейки матки человека), A549 (рак легкого человека), MiaPaCa (клетки рака поджелудочной железы человека), CoLo 357 (клетки рака поджелудочной железы человека), MCF-7 (клетки рака молочной железы человека), HT-29 (клетки рака прямой кишки человека) — применяли проточную цитометрию. Липосомы содержали зонд BODIPY-PC. На всех линиях получили минимум в 4 раза лучшее накопление MTX-липосом в клетках, по сравнению с липосомами без пролекарства за 60 мин инкубации (Рис. 16; А на примере клеток A549 и CoLo 357). Важно было также сравнить накопление MTX-липосом злокачественными клетками и условно нормальными. В качестве последних мы использовали линии 3T3 и HEK293T — мышечные фибробласты и эмбриональные клетки почки человека, соответственно. По данным

цитометрии, липосомы с **MTX-DG** значительно эффективнее связываются с опухолевыми клетками линии A549 и CoLo 357, чем с нормальными (**Рис. 16; А**). В целом, липосомы без пролекарства гораздо меньше накапливаются клетками всех линий.

Следующим шагом было проведение конкурентного ингибирования накопления липосом с **MTX-DG** опухолевыми клетками с целью выяснения роли специфического связывания во взаимодействии липосом с клетками. В качестве потенциальных рецепторов для МТХ-липосом мы предположили ФР- α и RFC.

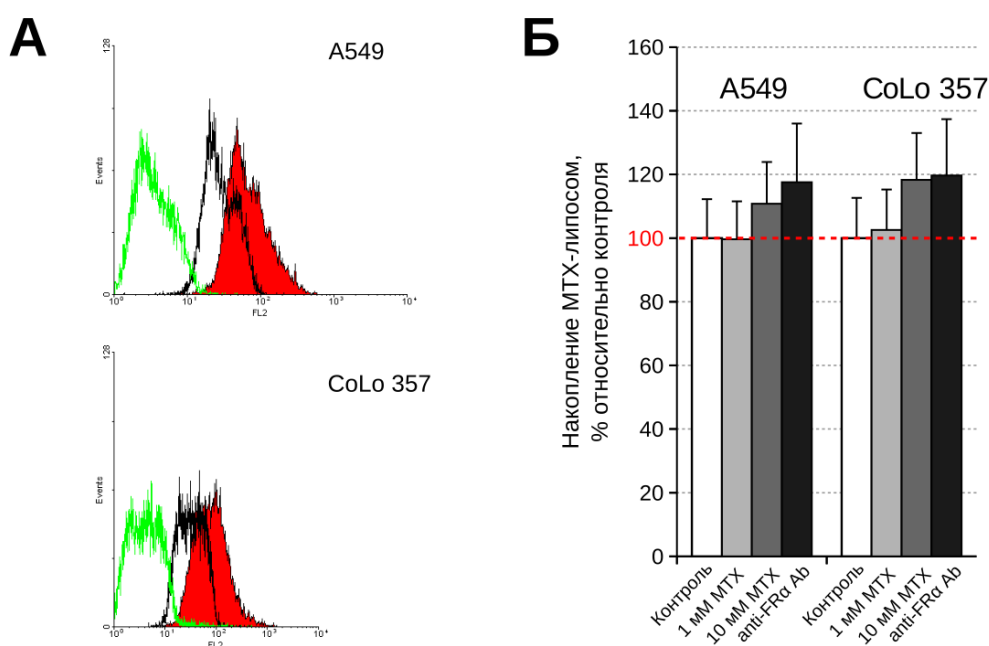


Рисунок 17. А. Экспрессия ФР- α клетками A549 и CoLo 357, гистограммы цитофлуориметрии. Зеленый — аутофлуоресценция клеток, черный — неспецифическая окраска вторичными антителами, красный — иммуноокрашивание антителами к ФР- α . Для проведения иммуноокрашивания клетки были зафиксированы PFA и пермеабелизованы 0.1% Triton X-100. Б. Конкурентное ингибирование накопления МТХ-липосом клетками A549 и CoLo 357 с помощью избытка свободного МТХ (100- и 1000-кратный избыток относительно остатка МТХ-DG в липосомах, 1 мМ и 10 мМ соответственно) и антителами к ФР- α человека (anti-FR α Ab, 10 мкг/мл). Монослой клеток на 24-луночных планшетах инкубировали со свободным МТХ или антителами 1 ч при 37°C, после чего добавляли МТХ-липосомы (100 мкМ суммарные липиды, 10 мкМ МТХ-DG), предварительно промывая клетки PBS или без промывки. Через 1 ч клетки промывали PBS, суспендировали 0.02% EDTA и анализировали на проточном цитометре, приведены средние значения \pm SE измерений.

Для оценки нативного уровня экспрессии ФР- α для выбранных клеточных линий, в том числе A549, CoLo 357 и MiaPaCa, было проведено не прямое иммуноокрашивание. Следует отметить, что в лабораторных условиях доступность и количество ФР на поверхности клеток может регулироваться условиями культивирования. Например, Женг и соавт. [160] для одной линии клеток (ЕМТ6, рак молочной железы мыши) получали ФР-положительные и ФР-отрицательные сублинии. ФР-положительные клетки были получены культивацией в среде без ФК (не менее

четырёх пассажей), чтобы повысить число свободных для связывания ФР на поверхности клетки, а ФР-отрицательные клетки культивировали в среде с нормальным содержанием ФК. Очевидно, регулируется именно доступность рецептора, а не его экспрессия (предположительно, она постоянная и одинаковая для двух сублиний). К сожалению, авторы не приводят каких-либо прямых доказательств различий в доступности ФР или его экспрессии на уровне РНК или белка, хотя приводят убедительные результаты по изменению накопления наночастиц с ковалентно привитой фолиевой кислотой на этих сублиниях клеток. Также показано практически полное ингибирование накопления наночастиц при обработке клеток антителами к ФР [160]. Другой пример — работа Редди и соавт. [161], где несколько клеточных линий постоянно культивировали в среде без ФК и определяли количество ФР во фракции мембранных белков (т.е. в данном случае доступность рецептора одинакова, а уровень экспрессии различен). В таких условиях клетки линии KB рассматривались как ФР-положительные (80.0 пмоль/мг общего белка), а A549 — как ФР-отрицательные (1.3 пмоль/мг). Авторы показали селективное токсическое действие производных майтанзина², конъюгированных с фолиевой кислотой, на ФР-положительных клетках и отсутствие такового для ФР-отрицательных клеток. В условиях дефицита ФК в культуральной среде, введение всего 100 мкМ ФК способно было ингибировать связывание исследуемых молекул. В то же время, для клеток A549 показано, что длительная культивация в среде без ФК приводит, наоборот, к появлению на их поверхности большего количества ФР [162]. В условиях культивирования в стандартной среде с нормальным содержанием ФК на клетках A549, ФР не детектировался методами иммуноокрашивания (проточная цитометрия, конфокальная микроскопия) и вестерн блоттинга, а при культивировании без ФК через 10 недель детектировался стабильный высокий уровень экспрессии ФР. В нашей работе было принято решение вести культивацию клеток в среде со стандартной концентрацией фолиевой кислоты. По данным проточной цитометрии, все исследованные клеточные линии показали приблизительно одинаковый уровень экспрессии ФР- α : сигнал специфического окрашивания в 2-2.5 раза превышал сигнал контроля окрашивания неспецифическими вторичными антителами (**Рис. 17; А**). Оценку экспрессии ФР- α на качественном уровне провели также с помощью конфокальной микроскопии, при этом обнаружили рецептор, равномерно распределенный по мембране клеток A549 и CoLo 357 (данные не приведены).

²Майтанзин — ингибитор роста опухолевых клеток выделенный из растения *Maytenus ovatus*, макролид анзамицинового типа, воздействует на тубулин и формирование микротрубочек; в индивидуальной форме прошел вторую фазу клинических испытаний, но не прошел третью фазу из-за недостаточной эффективности, по этой причине активно ведется поиск систем его доставки и модификации.

Избыток высокоаффинных антител к ФР- α (10 мкг/мл) не ингибировал процесс накопления МТХ-липосом клетками (Рис. 17Б). Инкубации с 10-, 100-, 1000- и 2000-кратным избытком ФК по отношению к остатку МТХ в липосомах также не ингибировали их накопление (данные не приведены). Обработки клеток свободным МТХ в 100- и 1000-кратном избытке в режиме ко-инкубации и последовательной инкубации с МТХ-липосомами также не дали результата (Рис. 17; Б). Как уже упоминалось, МТХ транспортируется в клетку через RFC и, в случае его участия в транспорте МТХ-липосом, избыток свободного МТХ должен был бы препятствовать накоплению МТХ-липосом клетками.

Таким образом, ни ФР- α , ни RFC не играют ключевой роли в проникновении МТХ-липосом в клетки. Тем не менее, мы полагаем, что какие-то специфические взаимодействия между МТХ-липосомами и опухолевыми клетками имеют место, иначе сложно объяснить более эффективное накопление опухолевыми клетками этих липосом, по сравнению с липосомами без пролекарства (Рис. 16; А). Действительно, липосомы с МТХ-DG имеют еще больший отрицательный заряд поверхности, чем липосомы без пролекарства – дзета-потенциалы равны – 53 мВ и –42 мВ, соответственно [163], – что должно было бы препятствовать их контакту с клетками, если бы не участие неких специфических взаимодействий. Известно, что большинство клеток экспрессирует на поверхности отрицательно заряженные протеогликаны (в основном, сульфатированные) [96]. В целом, можно заключить, что включение МТХ-DG в липосомы способствует их накоплению клетками, в особенности опухолевыми.

3.2.3. Изучение механизма эндоцитоза липосом клеткой

Проточная цитометрия позволяет получать количественные данные о кинетике накопления липосом клеткой и степени ингибирования этого процесса после действия того или иного блокатора. Классические ингибиторы — химические вещества, оказывающие действие на один или несколько путей эндоцитоза — получили наибольшее распространение. Подробное описание ингибиторов и условий их применения в приложении к липосомам можно найти в работе [164]. Ограничения подхода и возможные сложности наиболее полно описаны в других публикациях [79,165].

Для выяснения механизмов проникновения МТХ-липосом в клетку мы применили следующие вещества: *хлорпромазин* – ингибитор клатрин-опосредованного эндоцитоза, мембранотропный агент, действующий обратимо; *метил- β -циклодекстрин* – связывает холестерин мембраны, ингибирует в большей степени кавеолин- и в меньшей клатрин-опосредованный варианты эндоцитоза; *цитохалазин В* – ингибитор полимеризации актина, затрагивает практически все типы эндоцитоза; *колхицин* – ингибитор полимеризации тубулина;

нокодазол – деполимеризует микротрубочки, предотвращает слияние транспортных везикул с поздними эндосомами и, следовательно, закисление содержимого транспортных везикул.

Нами получен большой набор данных для четырех линий опухолевых клеток (A549, CoLo 357, MCF-7, HT-29), однако он не позволяет составить однозначное представление о механизмах проникновения МТХ-липосом в клетку, так как ингибирование практически во всех случаях было слишком слабым. Более того, в случае *метил-β-циклодекстрина* в рабочем диапазоне концентраций (0.1 — 10 мМ) наблюдалось увеличение сигнала флуоресценции, то есть стимулирование накопления липосом вместо ингибирования. Очевидно, этот агент действует на мембрану клеток так, что клетки активно поглощают липосомы для восполнения дефицита холестерина. Возможно также и разрушающее действие ингибитора на липосомы, в результате чего флуоресцентный зонд встраивается в мембрану клетки сам по себе, и сигнал не отражает накопление липосом. Кроме того, в концентрациях выше 1 мМ *метил-β-циклодекстрин* оказывал сильное токсическое действие на клетки (более 50% клеток были мертвыми), а выжившие клетки накапливали в несколько раз больше МТХ-липосом по сравнению с контролем, вероятно, из-за повышенной проницаемости мембраны; в меньших же концентрациях не было ни токсического, ни ингибирующего эффектов. Единственным однозначно проявившим себя ингибитором был *хлорпромазин*. Во всех экспериментах он вызывал концентрационно-зависимое снижение накопления липосом – до 40% и менее (**Рис. 16; Б**; данные приведены для клеток A549, для других линий клеток эффекты были схожими). Интересно отметить, что для липосом без МТХ-DG ингибирование было несколько более выраженным. В связи с этим, можно предположить, что для МТХ-липосом существует какой-то дополнительный путь проникновения в клетку (**Рис. 16; А**). Ингибирование накопления МТХ-липосом на ~30% наблюдали под действием *цитохалазина В*, что может говорить о вовлеченности клатрин-независимых путей эндоцитоза в интернализацию липосом, поскольку полимеризация актина играет ключевую роль именно в клатрин-независимых путях эндоцитоза [166].

По всей видимости, МТХ-липосомы проникают в клетку используя множественные механизмы, в том числе и клатрин-независимый эндоцитоз.

3.2.4. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом: мониторинг с помощью двойного флуоресцентного мечения

Как и в экспериментах с SiaLe^X-липосомами (раздел 3.1.6), для отслеживания связывания и внутриклеточной разгрузки, то есть для дестабилизации МТХ-липосом мы применили метод двойного флуоресцентного мечения липосом в сочетании с проточной цитометрией, описанный

в работе [142]. Были получены контрольные (пустые, без MTX-DG) липосомы и MTX-липосомы, несущие в бислое родамин-меченый липид (Rhod-PE), а во внутреннем водном объеме — кальцеин в высокой концентрации (самозатушен).

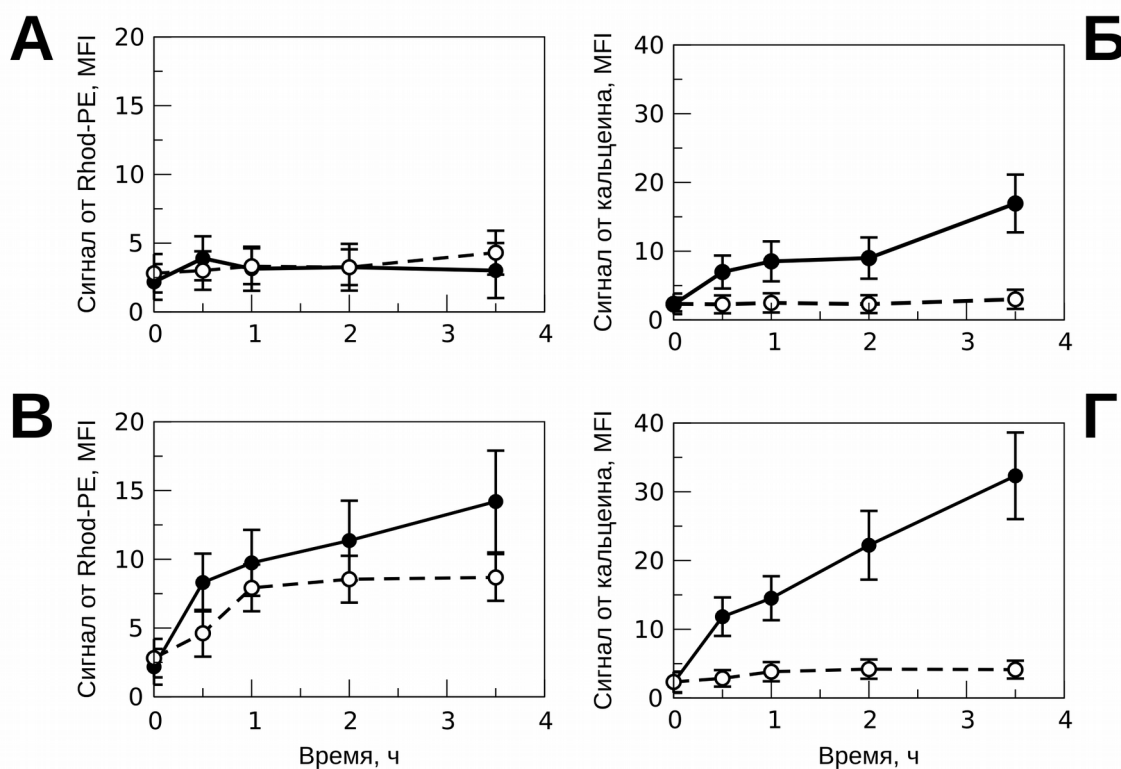


Рисунок 18: Кинетика накопления и внутриклеточной разгрузки MTX-липосом; **А, Б** пустые липосомы, **В, Г** MTX-липосомы. Клетки промывали от ростовой среды, охлаждали на льду, добавляли липосомы в среде без сыворотки (100 мкМ) и инкубировали указанные промежутки времени при 4°C (пунктир) или 37°C (сплошная линия). После чего клетки промывали PBS, суспендировали раствором 0.02% EDTA и анализировали на проточном цитометре. Результаты приведены для клеток линии A549, на других линиях клеток получены аналогичные результаты, приведены средние значения \pm SE измерений.

Пустые липосомы лишь незначительно накапливаются клетками как при 4°C, так и при 37°C (**Рис. 18; А**), причем связавшиеся липосомы начинают очень медленно дестабилизироваться только при 37°C (при 4°C сигнал кальцеина остается постоянным, **Рис. 18; Б**). MTX-липосомы накапливаются клетками несколько более эффективно (**Рис. 18; В**), что согласуется с данными по накоплению MTX-липосом, меченных BODIPY-PC (см. раздел 3.2.2, **Рис. 16; А**). Кинетика разгорания кальцеина MTX-липосом отличается не очень сильно от таковой для пустых липосом — можно предположить, что MTX-DG, хотя и способствует связыванию липосом с клеткой, но не оказывает существенного влияния на внутриклеточную разгрузку (**Рис. 18; В, Г**). В условиях избытка липосом в среде постоянный рост сигнала Rhod-PE говорит о непрерывном накоплении липосом клеткой (**Рис. 18; В**), в таком случае говорить о внутриклеточной

дестабилизации липосом можно лишь когда рост сигнала кальцеина существенно превышает рост сигнала Rhod-PE. Другими словами, важно соотношение сигналов кальцеина и Rhod-PE. Слепушкин и соавт. [142] утверждают, что существенная внутриклеточная разгрузка липосом имеет место, когда сигнал кальцеина в 8-10 раз превышает сигнал Rhod-PE. В нашем случае, за 3.5 ч сигнал кальцеина превысил сигнал Rhod-PE в 5.5 раз для пустых липосом и в 2.5 раза для МТХ-липосом. Можно предположить, что процесс внутриклеточной разгрузки за 3.5 ч прошел лишь незначительно. Увеличить время инкубации в среде без сыворотки нам не удалось из-за нежизнеспособности клеток в таких условиях. При переходе к более длительным инкубациям в полной ростовой среде, на фоне постоянного роста сигнала Rhod-PE, достоверно выявить процесс раскрытия липосом оказалось невозможно.

Важно, что при 4°C сигнал кальцеина МТХ-липосом не меняется (**Рис. 18; Г**) — это позволяет заключить, что спонтанного внеклеточного раскрытия липосом не происходит и, будучи ассоциированными с клеточной поверхностью, липосомы сохраняют свою целостность. Разрушение бислоя липосом (вытекание кальцеина) в условиях эндоцитоза при 37°C можно интерпретировать как включение компонентов липосом в состав мембранных структур клетки. Таким образом, разгрузка МТХ-липосом в опухолевых клетках происходит гораздо медленнее, чем разгрузка SiaLe^x-липосом с пролекарством мелфалана в активированных эндотелиальных клетках (**Рис. 19; Г**).

3.2.5. Синтез флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата

С целью изучения внутриклеточного транспорта **МТХ-DG** нами был разработан синтез его флуоресцентного аналога, несущего BODIPY-метку при концевом метиле алифатической цепи (**BODIPY-МТХ-DG**). Выбор BODIPY-метки обусловлен высоким квантовым выходом этого флуорофора; отсутствием влияния на спектр флуоресценции полярности окружения, что особенно важно при изучении локализации зонда в различных клеточных органеллах; отсутствием перекрывания спектров флуоресценции BODIPY-метки и поглощения МТХ; возможностью включения в бислой до 10% мол. BODIPY-метки без искажения упаковки липидов [167].

Стратегия синтеза BODIPY-МТХ-DG была выбрана по аналогии с ранее отработанной схемой получения самого пролекарства МТХ-DG [159,168] с изменениями на стадии ацилирования моноглицерида остатками жирных кислот. Синтез включал восемь стадий (Схема 1). На первой стадии получали моноглицерид- β -Вос-аланина (**I**) из *rac*-изопропилиденглицерина и небольшого избытка β -Вос-аланина. Снятие ацетонидной защиты

проводилось в достаточно мягких условиях (0.2 М HCl, [169]), по сравнению с другими методами (TFA в THF и воде [170], TsOH в CH₃OH в течение 5 ч [171])

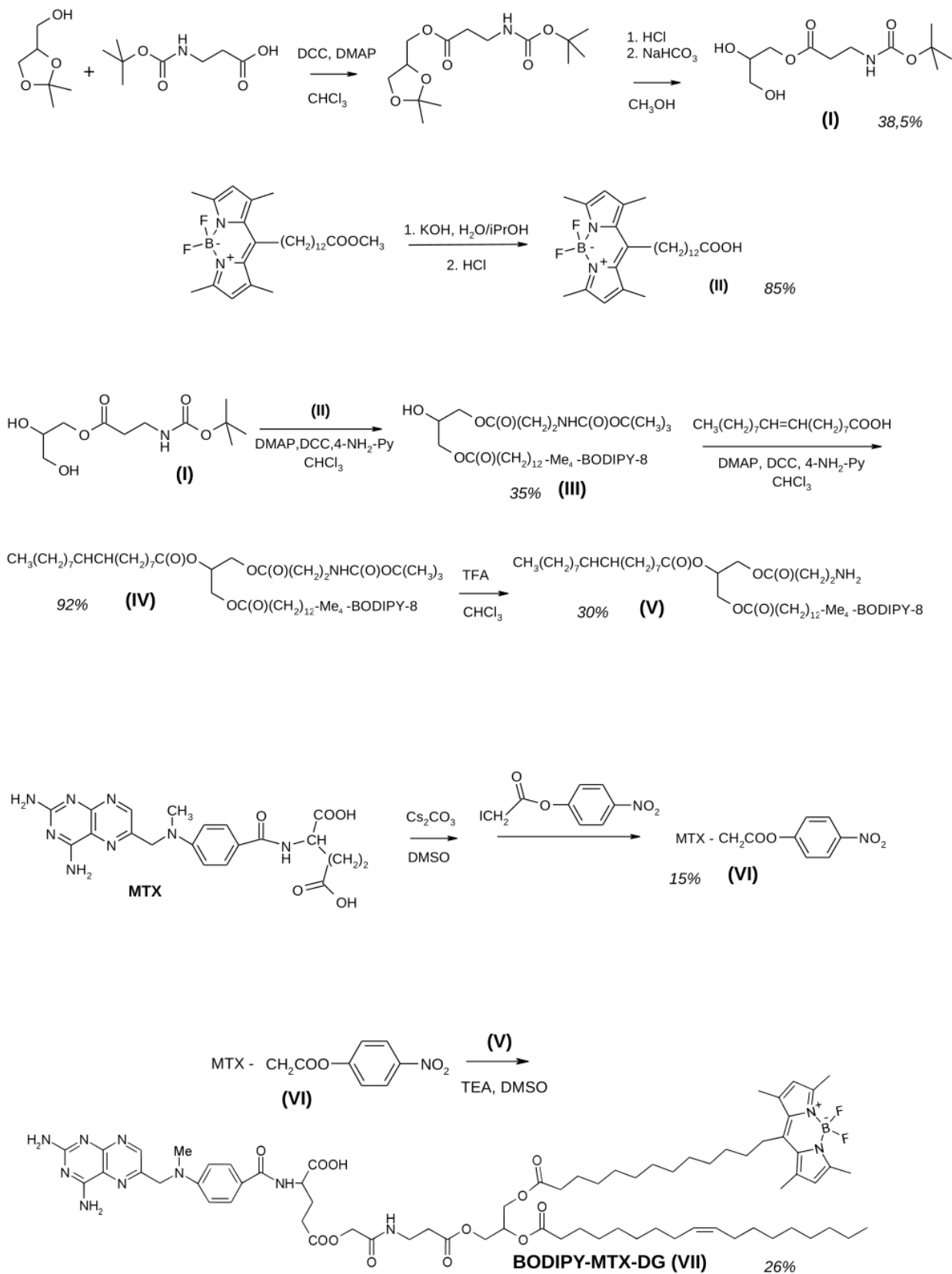
Полученный моноглицерид (I) ацилировали 13-BODIPY-тридекановой кислотой (II) (продукт омыления Me-эфира) в присутствии дициклогексилкарбодиимида и основных катализаторов (реакция протекает преимущественно по первичному гидроксилу; 4-аминопиридин позволяет ускорить ацилирование [172] и минимизировать образование продукта конденсации по двум OH-группам). Причем в случае избытка моноглицерида (1.2 экв.) при всех прочих условиях реакция получения диглицерида (III) проходит значительно быстрее (5.5 ч) и с бóльшим выходом (35%), чем с применением такого же избытка кислоты (17 ч; 28.6%).

Диглицерид (III) ацилировали действием 1.5 экв. олеиновой кислоты и выделяли триглицерид (IV) гель-фильтрацией на липофильном сефадексе (выход 92%); все предшествующие продукты ацилирования выделяли хроматографией на силикагеле (выходы 35–37%). Вос-защиту снимали в максимально мягких условиях (TFA, 0°C, 30 мин), чтобы избежать присоединения трифторацетата по двойной связи, а также деградации BODIPY-группы. Однако такая деградация все-таки происходила (выход продукта 30%). Другие известные методы деблокирования Вос-группы (например, 98% HCOOH) приводили к полному разрушению флуорофора.

На заключительной стадии *rac*-1-[13-BODIPY-тридеканойл]-2-олеоил-3-(3-аминопропионил)глицерин (V) ацилировали активированным эфиром (VI) в диметилсульфоксиде с триэтиламин. Эфир (VI) получали взаимодействием цезиевой соли метотрексата с 1.5 экв. (*p*-нитрофенил)йодацетата, как описано ранее: быстрое алкилирование (менее 5 мин) соли МТХ йодацетатом дает преимущественно γ -моноэфир (γ/α -моноэфир ~ 16.6) [159].

Поскольку часть амина (V) находилась в солевой форме с трифторуксусной кислотой, для создания слабощелочного значения pH к реакционной смеси потребовалось прибавлять избыток триэтиламина. Целевой продукт (VII) частично отделяли от низкомолекулярных соединений гель-фильтрацией на липофильном сефадексе, а затем выделяли хроматографией на силикагеле (выход 26%). Продукт охарактеризован ¹H-ЯМР, спектрофотометрически и спектрофлуориметрически, спектры оптического поглощения и испускания флуоресценции приведены в Приложении 1. Квантовый выход (Q) для нового зонда ($\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}} 498 \text{ нм}/506 \text{ нм}$) был рассчитан относительно стандарта родамина-6G и составил 0.636. Уменьшение квантового выхода по сравнению с BODIPY-меткой как таковой ($Q \approx 1$), по-видимому, обусловлено внутримолекулярным взаимодействием BODIPY-группы и птероинового остатка МТХ.

Схема 1. Синтез *rac*-1-[13-BODIPY-тридеcanoил]-2-олеилглицеро-3-(β-аланил-N-карбонилметил)метотрексата



3.2.6. Внутриклеточное распределение липофильного пролекарства метотрексата

На **Рис. 19** представлены изображения клеток A549 после инкубации с МТХ-липосомами, меченными зондом **BODIPY-MTX-DG** (клетки окрашены трекером эндоплазматического ретикулума). Сначала клетки инкубировали с липосомами на льду, чтобы исключить эндоцитоз, затем отмывали от несвязавшихся липосом и переносили в физиологические условия. Такая предварительная обработка синхронизирует процесс интернализации липосом, то есть в дальнейшие опыты с инкубацией при 37°C не вмешиваются связывание и поглощение новых порций липосом. Судя по динамике внутриклеточной доставки, процесс идет достаточно медленно, 2 ч и более, что согласуется с данными проточной цитометрии о медленной дестабилизации МТХ-липосом в условиях эндоцитоза (**Рис. 18**). Причем зонд обнаруживается в клетке в составе везикулярных структур, в то время как ЭПР окрашивается диффузно, что свидетельствует об отсутствии встраивания пролекарства метотрексата в его структуру.

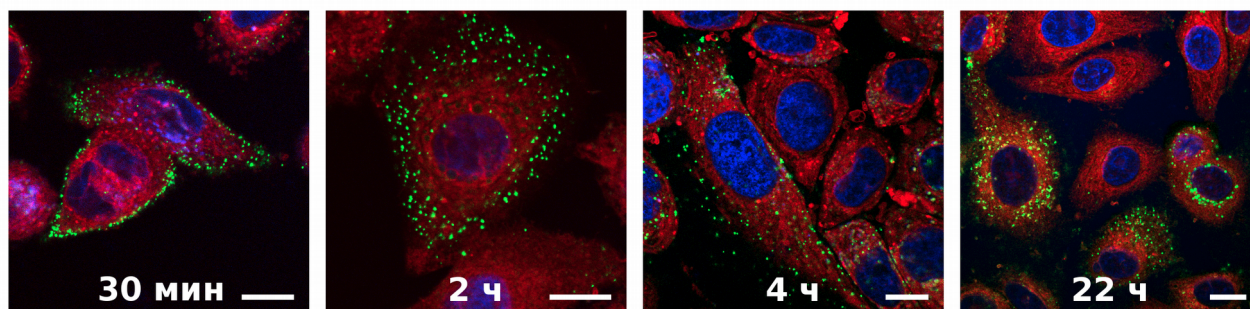


Рисунок 19: Конфокальная микроскопия доставки пролекарства метотрексата МТХ-липосомами в клетки A549 относительно эндоплазматического ретикулума. Мембрана липосом содержит BODIPY-MTX-DG (зеленый); ЭПР визуализован с помощью ER-трекера (красный); ядра клеток окрашены Hoechst (синий). Перед началом эксперимента клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (9% мол. МТХ-DG, 1% мол. BODIPY-MTX-DG, 100 мкМ суммарные липиды) 60 мин на льду, промывали и затем инкубировали указанные промежутки времени при 37°C в полной ростовой среде. Масштабная линейка 10 мкм.

Для отслеживания локализации МТХ-липосом на ранних временах инкубации мы применили трекеры ранних эндосом (конъюгат трансферрина с красной флуоресцентной меткой), а также аппарата Гольджи и гликокаликса (лектин WGA). Клетки инкубировали 30 мин при 37°C с избытком липосом в среде (без удаления несвязавшихся липосом) для повышения чувствительности детектирования. Результаты представлены на **Рис. 20**. Очевидно, что МТХ-липосомы колокализуются лишь с контуром гликокаликса: ни в ранних эндосомах, ни в ЭПР сигнала зонда не наблюдается. Более длительные инкубации в условиях избытка МТХ-липосом

в среде (1 ч и 3 ч) не позволили корректно оценить динамику внутриклеточного распределения пролекарства на фоне непрерывного поглощения новых порций липосом из внешней среды (**Рис. 21**, на примере трансферрина). Поэтому были проведены отмывки от несвязавшихся липосом и дальнейшая инкубация в течение 20 ч, чтобы бóльшая часть липосом оказалась интернализованной. Через 20 ч трекер WGA четко очерчивал границы клетки с включенными в цитоплазме везикулярными структурами, содержащими **BODIPY-MTX-DG**, причем совпадений с трекером ранних эндосом практически не наблюдалось (данные не приведены). Приведенные на **Рис. 19** данные с метчиком ЭПР подтверждают, что пролекарство в составе липосом либо других везикулярных структур с периферии клетки перемещается ближе к ядру. Аналогичные результаты были получены нами на клетках мышинных фибробластов 3Т3 в тех же условиях инкубации.

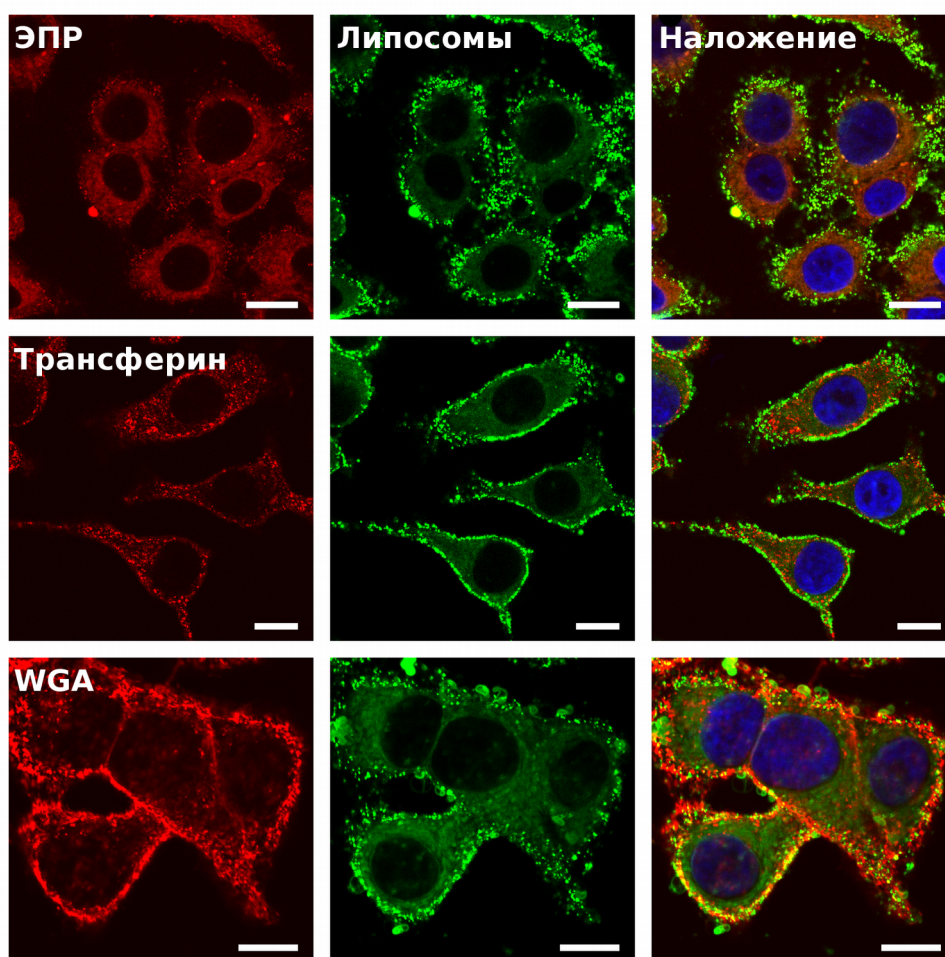


Рисунок 20: Распределение в клетке MTX-липосом с меткой BODIPY-MTX-DG в бислое (зеленый). Колокализация с метчиками (красный) ранних эндосом (трансферин), эндоплазматическо ретикулума (ЭПР), гликокаликса и аппарата Гольжиди (WGA). Ядра клеток A549 предварительно окрашивали Hoechst (синий), далее проводили совместную инкубацию с липосомами (100 мкМ суммарные липиды) и трекерами в течение 30 мин при 37°C, после чего клетки промывали и фиксировали 1% PFA (15 мин, 37°C). Масштабная линейка 10 мкм.

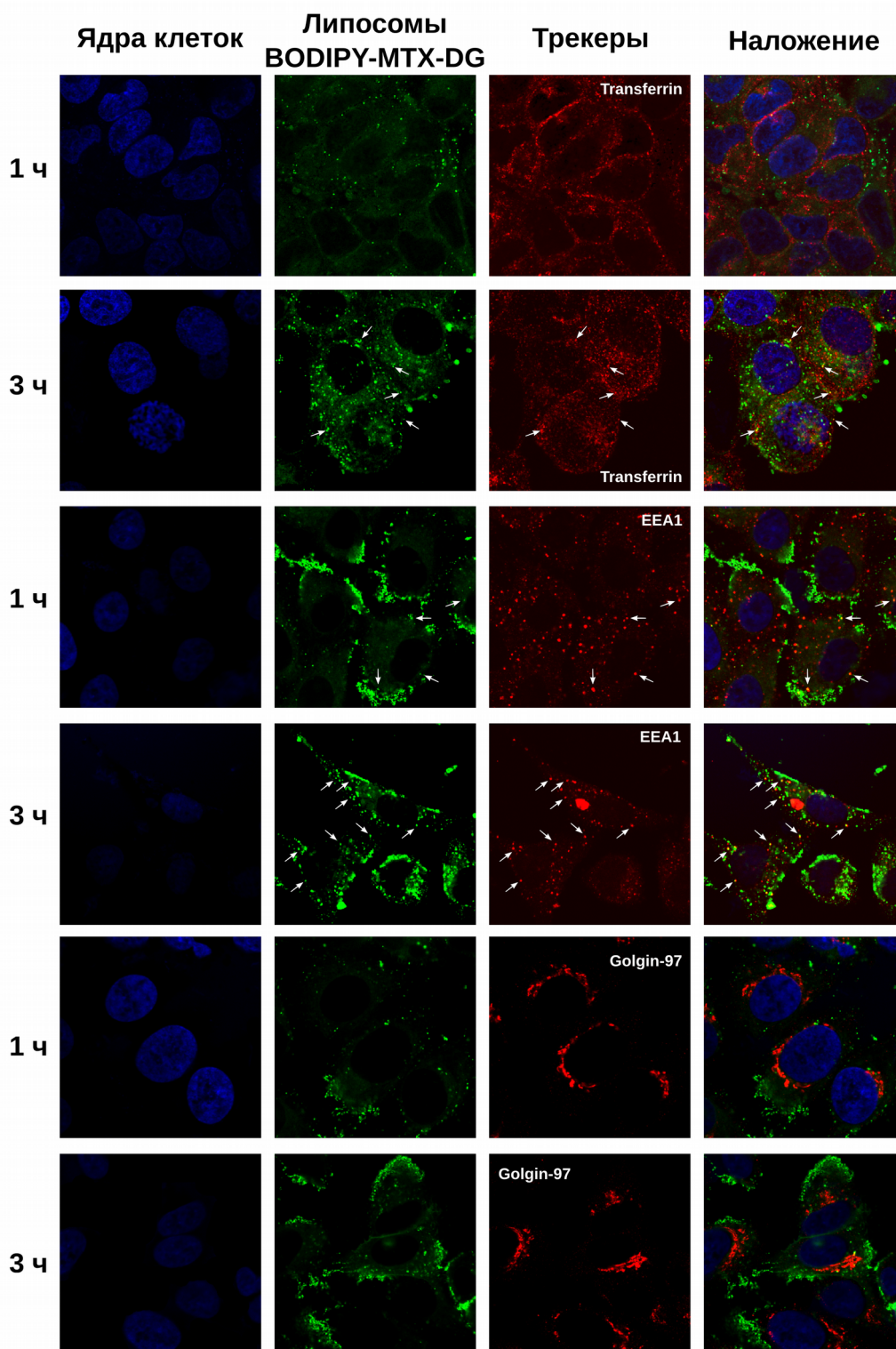


Рисунок 21. Распределение в клетке пролекарства метотрексата (BODIPY-MTX-DG, зеленый) после инкубации с МТХ-липосомами. Колокализация с метками (красный) ранних эндосом (Transferrin и Early Endosome Antigen-1 (EEA1)) и аппарата Гольджи (Golgin-97). Ядра клеток A549 предварительно окрашивали Hoechst (синий), далее инкубировали с МТХ-липосомами (100 мкМ) 1 ч или 3 ч при 37°C, после чего клетки промывали и фиксировали 1% PFA (15 мин, 37°C). Более подробно см. Материалы и методы. Белые стрелки указывают на места ко-локализации липосом и трекеров.

Локализацию пролекарства метотрексата в клетке проверяли также относительно белковых маркеров: EEA1 (early endosome antigen-1, маркер ранних эндосом) и Golgin-97 (специфический белок аппарата Гольджи). Визуализация этих белков требует окраски вторичными антителами с флуоресцентной меткой. Связывание первичных антител с живой клеткой оказалось неэффективным, поэтому для повышения доступности антигенов клетки были зафиксированы и пермеабелизованы для увеличения проницаемости клеточной мембраны. Важно отметить, что липосомы очень чувствительны ко всем методам пермеабелизации, но мы подобрали условия, позволяющие максимально сохранить сигнал липосом и одновременно увеличить доступность антигена — это обработка фиксированных клеток 0.05% раствором сапонины. Показано, что метчик Golgin-97 и **BODIPY-MTX-DG** локализуются в разных участках клетки как через 1 ч, так и через 3 ч инкубации (без отмывок), то есть накопления пролекарства в аппарате Гольджи, скорее всего, не происходит (**Рис. 21**). При использовании EEA1, как и трансферрин, в некоторых случаях после 3-ч инкубации можно заметить лишь редкие совпадения локализации (**Рис. 21**).

Для отслеживания внутриклеточного транспорта отдельных компонентов МТХ-липосом — пролекарства и матричных липидов — бислой метили как **BODIPY-MTX-DG**, так и **Rhod-PE** (референсный матричный липид). Клетки A549 выдерживали с липосомами на льду, отмывали от несвязавшихся липосом и затем инкубировали при 37°C в полной клеточной среде. Результаты мониторинга, представленные на **Рис. 22**, подтверждают медленное проникновение МТХ-DG в клетки. В начальный момент инкубации связанные с клетками липосомы выглядят как желтые и желто-красные яркие точки (наложение зеленого и красного сигналов флуоресценции) по контуру мембран клеток. Принципиально картина начинает меняться через 2 ч, когда наряду с желтыми и желто-красными пятнами появляются участки с зелеными окрашиванием. Процесс разделения красного и зеленого флуорофоров максимально отчетливо виден через 4 ч инкубации и позже. Необходимо отметить, что красная флуоресценция родаминильной группы существенно ослабевает при многочасовых инкубациях, что, несомненно, связано с метаболизмом этого флуорофора [173–175].

Таким образом разделение компонентов липосом наступает в интервале от 2 до 4 ч после связывания с клетками. Связанные с поверхностью клетки МТХ-липосомы интернализируются только через 1.5-2 часа, вероятно, в виде комплексов с фрагментами бислоя или как отдельные молекулярные компоненты в составе фрагментов клеточной мембраны. Достаточно длительное нахождение липосом на поверхности клетки, вероятно, обусловлено их отрицательным зарядом. Можно предположить, что интернализации липосом предшествует их слияние с клеточной мембраной. В цитоплазме везикулярное распределение пролекарства сохраняется вплоть до 20

часов, однако эти везикулы не относятся к какой-либо органелле клетки. Отсутствие совпадений сигналов этих везикул и Trf не позволяет отнести их к клатриновым везикулам, хотя участие этого механизма эндоцитоза показано с помощью ингибирования хлорпромазином (**Рис. 16, А**). Такое противоречие может быть объяснено тем, что Trf присутствует только в рециркулирующих эндосомах: Trf связывается с рецептором трансферрина на поверхности клетки, эндоцитируется через клатриновые везикулы и затем рециркулирует клеткой из ранних эндосом обратно к плазматической мембране [176]. Каким бы ни было дальнейшее распределение пролекарства метотрексата в клетке, полученные нами данные позволяют утверждать, что МТХ-липосомы способны эффективно доставлять пролекарство в клетку.

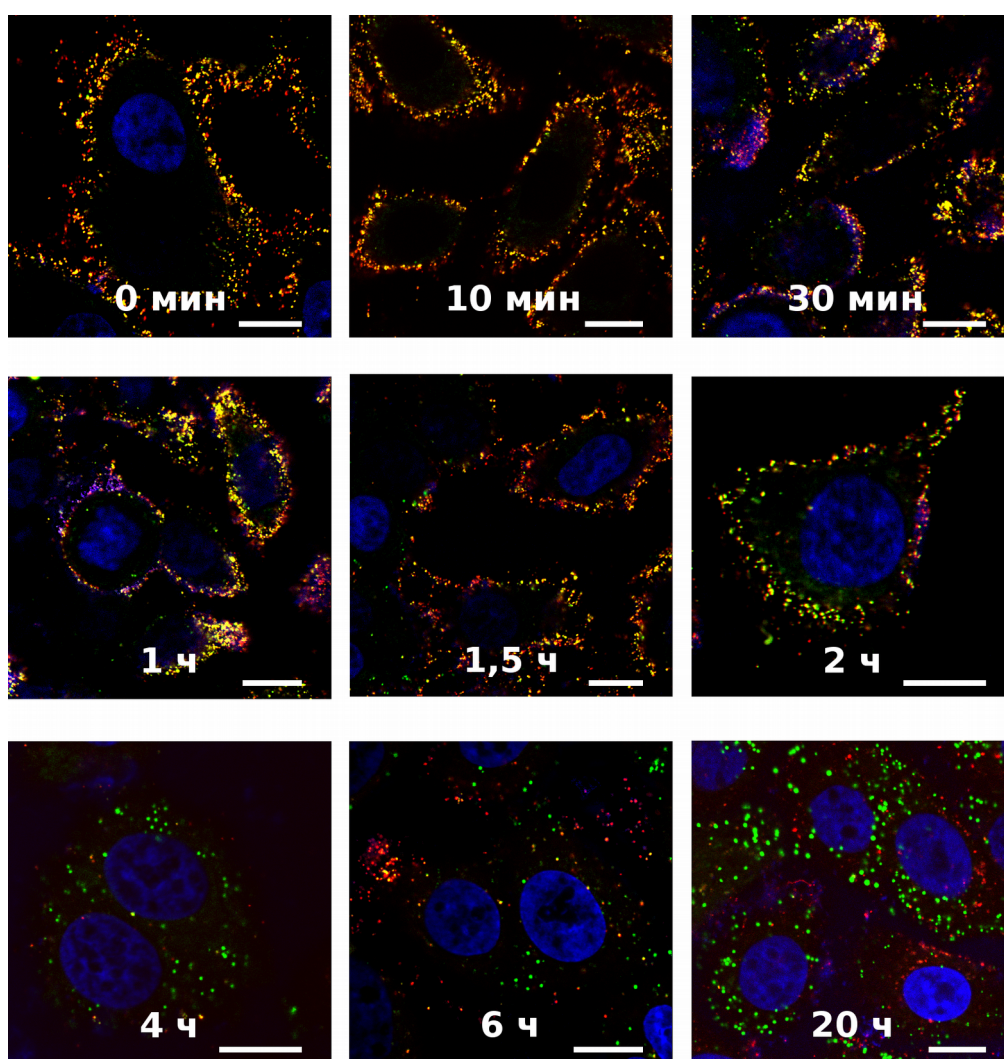


Рисунок 22: Конфокальная микроскопия динамики разделение компонентов МТХ-липосом в клетках А549. Мембрана липосом содержит фосфолипидный зонд Rhod-PE (красный) и BODIPY-MTX-DG (зеленый); ядра клеток окрашены Hoechst (синий). Перед началом эксперимента клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (9% мол. МТХ-DG, 1% мол. BODIPY-MTX-DG, 1% мол. Rhod-PE, 100 мкМ суммарные липиды) 30 мин на льду, промывали и затем инкубировали указанные промежутки времени при 37°C в полной ростовой среде. Масштабная линейка 10 мкм.

Можно заключить, что взаимодействия с клетками-мишенями противоопухолевых наноразмерных липосом, несущих в жидкофазном липидном бислое липофильные пролекарства, осуществляются посредством различных механизмов, которые зависят от структуры лекарства и наличия на поверхности липосом специфического лиганда. В случае пролекарства мелфалана представляло интерес изучить взаимодействия SiaLe^x-липосом, нацеленных на эндотелиальные клетки, так как ранее было обнаружено, что такие липосомы ингибируют рост опухоли через подавление ее васкуляризации. В данной работе показано, что наличие SiaLe^x-лиганда обеспечивает селективное взаимодействие липосом, нагруженных Mph-DG, с активированными эндотелиальными клетками и последующую быструю (в течение минут) интернализацию и внутриклеточную разгрузку липосом. Липосомы без SiaLe^x-лиганда многократно менее эффективно связываются с эндотелиальными клетками независимо от их активации. Для липосом с пролекарством метотрексата важно было проверить возможную роль самого остатка лекарства в нацеливании на опухолевые клетки, поскольку для ряда опухолей эпидермоидного происхождения известна повышенная экспрессия фолатного рецептора. Действительно, включение МТХ-DG в липосомы усиливает их накопление опухолевыми клетками больше, чем нормальными. Однако участие в этом процессе фолатного рецептора не подтвердилось. По данным ингибирования специфическими блокаторами эндоцитоза, клетки поглощают МТХ-липосомы посредством нескольких механизмов, включая клатрин-независимый. Перед интернализацией МТХ-липосомы остаются на цитоплазматической мембране не менее 1.5-2 ч, а затем пролекарство и матричные липиды медленно поступают в цитоплазму, причем уже разделившись на отдельные везикулярные структуры. Так липосомы обеспечивают внутриклеточное высвобождение МТХ-DG.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. Материалы и реагенты

В работе были использованы яичный фосфатидилхолин (PC, Lipoid, Германия), фосфатидилинозит из пекарских дрожжей (PI, выделен по методике [177]), SiaLe^x-PEG₈₋₁₅-DG синтезировали по методу, описанному в [132], пролекарства алкилирующего агента мелфалана (Miph-DG) и антиметаболита фолиевой кислоты метотрексата (MTX-DG) получали согласно методу, описанному в [159]; кальцеин (тетранатриевая соль бис[N,N-ди(карбоксиметил)аминометил]флуоресцеина, Sigma Aldrich, США), Hoechst 33342 (Sigma Aldrich, США), BODIPY-PC (1-пальмитоил-2-[7-BODIPY-гептаноил]-*sn*-глицеро-3-фосфохолин, Avanti Polar Lipids, США), Rhod-PE (N-(лиссамин родамин В) сульфонил)фосфатидилэтаноламин, Avanti Polar Lipids, США); (S)-(+)-2,2-диметил-1,3-диоксалан-4-метанол, *n*-нитрофениловый эфир йодуксусной кислоты и β-Вос-аланин, синтезированные ранее в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, дициклогексилкарбодиимид, 4-аминопиридин, 4-(N,N-диметиламино)пиридин, олеиновая кислота, DMSO сухой (Merck, ФРГ) метиловый эфир 13-BODIPY-тридекановой кислоты, любезно предоставленный к.х.н. Болдыревым И.А., трифторуксусная кислота (Fluka, Швейцария), метотрексат (±)-аметоптерин гидрат (Sigma, США), фолиевая кислота (Sigma Aldrich, США). Сухой хлороформ получали перегонкой над пятиокисью фосфора (P = 760 мм.рт.ст., $t_{кип} = 61^{\circ}\text{C}$). Другие растворители использовались после обычной очистки; DMSO дополнительно сушили над прокаленными молекулярными ситами 4Å. Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40-60 мкм и 60-200 мкм, Merck), для гель-фильтрации – сефадекс LH-20 (Pharmacia, Швеция). Для ТСХ использовали пластинки с флуоресцентным индикатором Kieselgel 60 F₂₅₄ и без индикатора Kieselgel 60 на алюминиевой подложке. Обнаружение пятен на хроматограммах проводили фосфорномолибденовой кислотой (ФМК), нингидрином или просматриванием пластинок в УФ- и видимом свете.

Спектры ¹H-ЯМР снимали на приборе Bruker WM-700 (США), УФ-спектры – на двухлучевом спектрофотометре СФ-256-УВИ (Ломофотоника, С.-Петербург), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония), масс спектры (MALDI-TOF) регистрировали на спектрометре UltraFlex (Bruker Daltonics, ФРГ) с использованием в качестве матрицы дигидроксibenзойной кислоты в виде 0.5 М раствора в MeOH с 0.1% трифторуксусной кислоты.

Для работ с культурами клеток были использованы буферы PBS (KH₂PO₄, 0.2 г/л;

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0.15 г/л; Na_2HPO_4 , 1.0 г/л; KCl , 0.2 г/л; NaCl , 8.0 г/л, pH 7.4) и DPBS (PBS с солями кальция и магния, ПанЭко), культуральные среды RPMI 1640, DMEM (ПанЭко, Россия), среда 199 (Gibco, США), эмбриональная телячья сыворотка (HyClone, США), эндотелиальный фактор роста, гепарин, гентамицин, L-глутамин, пенициллин, стрептомицин (ПанЭко, Россия); метчик ЭПР ER-Tracker™ Red (E34250, Invitrogen), конъюгат трансферрина с меткой Alexa Fluor®555 (Trf, T35352, Invitrogen), агглютинин из ростков пшеницы с меткой Alexa Fluor®555 (wheat germ agglutinin (WGA), W32464, Invitrogen); моноклональные антитела мыши к E-селектину человека (Santa Cruz Biotechnology, 2Q780), моноклональные антитела мыши к белку Golgin-97 человека (ThermoFisher, A21270), антитела мыши к белку человека Early Endosome Antigen-1 (EEA-1, eBioscience, #14-9114), поликлональные антитела кролика к фолатному рецептору человека- α (FL-257, Santa Cruz Biotechnology); вторичные антитела Alexa Fluor®555 anti-mouse goat IgG (Molecular Probes, A21425), bovine anti-rabbit IgG-PE (sc-3750, Santa Cruz Biotechnology). Манипуляции с клетками проводили с использованием шейкеров Biosan Microspin FV-2400 и Premed Micro-shaker type 326m, центрифуг Eppendorf centrifuge 5415 и Elmi multi centrifuge CM-6M.

4.2. Методы

4.2.1. УФ-спектроскопия

УФ-спектры веществ в этаноле снимали на двухлучевом спектрофотометре СФ-256-УВИ в кварцевых кюветках 1 x 1 см. Для разрушения липосом суспензию разбавляли 50-кратным избытком этанола.

4.2.2. Флуоресцентная спектроскопия

Спектры испускания флуоресценции исследуемых образцов снимали на спектрофотометре Hitachi F4000 в кварцевых кюветках при постоянном перемешивании. Флуоресцентный сигнал BODIPY-группы регистрировали в интервале 495-550 нм (λ_{max} 505 нм) при λ_{ex} 485 нм.

4.2.3. Проточная цитометрия

Анализируемые клетки суспендировали раствором 0.02% EDTA (10 мин, 37°C), разбавляли равным объемом 1% БСА в PBS с добавлением пропидий-йодида (0.3 мкг/мл, используется для оценки выживаемости клеток). Суспензии анализировали на проточном цитометре FACScan или

FACSCalibur (Becton Dickinson, США), с использованием программного обеспечения CELLQuest. Флуоресцентный сигнал детектировали в каналах FL1 (515–545 нм), FL2 (565–610 нм) и FL3 (> 650 нм), для каждого образца проводили по два измерения по 10 000 целевых событий каждое. Чтобы исключить из анализа агрегаты клеток, клеточный дебрис и мертвые клетки целевые события были выделены по прямому/боковому светорассеянию (FSC/SSC) и сигналу пропидий-йодида.

4.2.4. Конфокальная микроскопия

За день до эксперимента, исследуемые клетки пересаживали на покровные стекла (обычно $\sim 0.5 \times 10^6$ клеток/мл). Для улучшения адгезии клеток (особенно HUVEC) покровные стекла обрабатывали 0.2% желатином. Готовые препараты заливали полимеризующимся реагентом Mowiol 4.88 (Calbiochem) и анализировали на конфокальном микроскопе Nikon TE 2000 Eclipse (Япония) с использованием x40- и x60-объективов.

4.3. Приготовление и характеристика липосом

Стандартная схема

Смеси ePC–PI–MTX-DG/Mlph-DG, 8 : 1 : 1 (мол. соотношение), соупаривали из растворов в смеси хлороформ–метанол, 1 : 1, на роторном испарителе. Флуоресцентные липидные зонды для визуализации липосом, а также вектор для направленной доставки SiaLe^x-PEG₈₋₁₅-DG (от 2 до 10 % мол.) добавляли на стадии формирования липидной пленки. Липидные пленки высушивали 1 час при 5 Па, затем гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в буфере PBS (суммарная концентрация липидов в суспензии обычно составляла от 1 до 5 мМ). Суспензию подвергали 5-кратной процедуре замораживания–оттаивания (жидкий азот/+40°C) и продавливали 10 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размером пор 100 нм с помощью установки Mini-extruder от Avanti Polar Lipids (США). Конечную концентрацию продекарства контролировали по оптической плотности в максимумах поглощения (MTX-DG: $\lambda_{\text{макс.}} = 302$ нм, $\epsilon \sim 25000$ М⁻¹ см⁻¹; Mlph-DG: $\lambda_{\text{макс.}} = 258$ нм, $\epsilon \sim 19700$ М⁻¹ см⁻¹). Суспензии липосом, предназначенные для сравнительного анализа накопления клетками с помощью проточной цитометрии, предварительно были проанализированы на спектрофлуориметре для установления одинакового уровня флуоресценции в образцах.

Размер липосом контролировали методом динамического лазерного светорассеяния на приборе Brookhaven 90PLUS Particle Size Analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США). Проводили по меньшей мере 3 измерения разбавленных суспензий (50 мкг липидов/мл PBS), с использованием гелий-неонового лазера, $\lambda = 633$ нм, под углом 90°. Для определения ζ -

потенциала поверхности³ готовили образцы 200-нм МТХ-липосом в 1 мМ калий-фосфатном буфере, профильтрованном через 0.2-мкм фильтр, в присутствии 10 мМ КСl и 1 мМ EDTA с общей концентрацией липидов 0.95–1.0 мг/мл. Измерения проводили на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, США) при 25°C после 1 мин уравнивания дисперсии в одноразовых пластиковых кюветах с золотыми электродами при напряжении 150 В, силе тока 4 мА.

Готовые липосомальные дисперсии хранили при 4°C не более недели.

Липосомы нагруженные кальцеином

Для получения липосом содержащих кальцеин во внутреннем водном объеме, липидную пленку гидратировали 80 мМ раствором четырехнатриевой соли кальцеина в PBS и затем обрабатывали по стандартной схеме получения липосом. Отделение от невключившегося кальцеина проводили с помощью гель-хроматографии на колонке с Сефадексом G-50 (~ 1.1 × 19 см) уравниваемой в PBS. Концентрацию пролекарства и кальцеина после хроматографии определяли по оптической плотности (кальцеин: λ_{max} 497 нм, $\epsilon \sim 74,000$ л моль⁻¹ см⁻¹).

Липосомы нагруженные кальцеином использовали для отслеживания целостности бислоя: кальцеин во внутреннем водном объеме липосом находится в самозатухающем состоянии и имеет низкую интенсивность флуоресценции, а при разрушении бислоя кальцеин высвобождается во внешнюю среду, разбавляется, в результате чего растет флуоресцентный сигнал. Процент высвобождения кальцеина определяли по формуле:

$$\frac{I_i/I_T - I_0/I_T}{1 - I_i/I_T} \times 100\%$$

где I_i — интенсивность сигнала в данный момент времени, I_0 — интенсивность в начале измерения, I_T — сигнал от полностью разрушенного кальцеина после разрушения липосом детергентом Triton X-100 (1% по объему). Измерения проводили в 96-луночной планшете на ридере GloMax[®]-Multi instrument (Promega, США) с соответствующим набором фильтров (лех 490 нм, лем 510–570 нм).

Липосомы с двумя флуоресцентными метками

Для отслеживания процесса внутриклеточной разгрузки липосом использовали метод описанный в статье Слепушкина и соавт. [142]. В бислое липосом включали 1% мол. Rhod-PE, а во внутренний водный объем — 80 мМ кальцеин как описано выше. Конечную концентрацию липосом контролировали по оптической плотности Rhod-PE (λ_{max} 556 нм, $\epsilon \sim 82\,000$ М⁻¹ см⁻¹), кальцеина и пролекарства. Общее поглощение липосом отслеживалось по сигналу родамина, а

³ Определение ζ -потенциала поверхности проведено Н.Р. Онищенко (Кузнецовой).

разрушение липосом – по разгоранию флуоресценции кальцеина. Липосомы содержащие по одной метке (только Rhod-PE или только кальцеин) были приготовлены для настройки и компенсации сигналов родамина (канал FL2) и кальцеина (канал FL1) для проточной цитометрии.

4.4. Культуры клеток

Первичная культура клеток эндотелия кровеносных сосудов, полученная из пупочной вены человека от индивидуальных доноров⁴ (HUVES) была выделена по методу Яффе [178]. Вкратце: полученные вены канюлировали, заливали раствором диспазы (2 мг/мл в физиологическом растворе) и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем вены промывали физиологическим раствором, клетки собирали из перфузионного раствора центрифугированием при 1200 об/мин в течение 5 мин, ресуспендировали в среде 199 (Gibco, США) с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), эндотелиального фактора роста, гепарина (100 мкг/мл) и гентамицина (50 мкг/мл). Для работы использовали культуры первого пассажа на четвертые сутки после образования монослоя.

Клетки линии A549 (рак легкого человека), HeLa (рак шейки матки человека), MiaPaCa и CoLo 357 (клетки рака поджелудочной железы человека), MCF-7 (клетки рака молочной железы), HT-29 (клетки рака прямой кишки человека), 3T3 (фибробласты мыши), HEK293T (эмбриональные клетки почек человека) были получены из Российской коллекции клеточных культур. Для культивирования клеток использовали среды RPMI-1640 или DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия).

Культивирование всех клеточных линий проводили в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂.

4.5. Экспрессия E-селектина клетками HUVES

Наличие E-селектина на поверхности эндотелиальных клеток (HUVES) после активации фактором некроза опухоли-α (ФНО-α) оценивали с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Для активации в культуральную среду добавляли от 0.1 до 50 нг/мл ФНО-α и инкубировали 4 ч при 37°C.

В случае конфокальной микроскопии, активированные клетки инкубировали с первичными антителами к E-селектину человека (мышинные моноклональные IgG, Santa Cruz Biotechnology, 2Q780, разбавление 1:100) в течение часа при 37°C на шейкере, затем клетки отмывали DPBS и

⁴Выделение первичной культуры выполняла Капкаева М. Р. в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, лаборатория Щегловитовой О.Н.

фиксируют 1% PFA, 15 мин 37°C. Далее клетки промывали DPBS и окрашивали вторичными антителами (Alexa Fluor-555 anti-mouse goat IgG, Molecular Probes, A21425, разбавление 1:2000) в течение часа при 37°C, после чего клетки отмывали DPBS и готовые стекла анализировали на конфокальном микроскопе.

При анализе цитофлуориметрией, активированные клетки сначала промывали DPBS, затем открепляли раствором 0.02% EDTA, ресуспендировали в PBS, 1% БСА с добавлением первичных антител и инкубировали 1 ч при 4°C. Далее клетки промывали PBS/БСА (центрифугирование 5 мин при 500 g) и окрашивали вторичными антителами (FITC anti-mouse, детектирование в канале FL1) 1 ч при 4°C.

4.6. Накопление липосом с пролекарством мелфалана клетками HUVEC

Специфичность связывания

Для оценки специфичности липосом с лигандом SiaLe^x в отношении активированных эндотелиальных клеток, было проведено конкурентное ингибирование накопления липосом моноклональными антителами к E-селектину. Для этого за час до добавления липосом, активированные HUVEC обрабатывали избытком антител к E-селектину (10 мг/мл, 1 ч, 37°C) или неспецифическими IgG в качестве контроля, после чего ко-инкубировали с SiaLe^x-липосомами.

Чтобы уменьшить неспецифическое связывание и слияние липосом с клетками, на отдельных стадиях инкубацию проводили при пониженной температуре (4°C). Для конфокальной микроскопии, после инкубации с антителами, клетки охлаждали на льду, промывали холодным DPBS и добавляли липосомы (2 мол.% SiaLe^x, 25 μM суммарные липиды в среде без сыворотки, 1 ч на льду). Затем клетки промывали и фиксировали 1% PFA в течение ночи при 4°C.

Для проточной цитометрии, после инкубации с антителами, клетки промывали DPBS и инкубировали с липосомами (10 мол.% SiaLe^x, 50 μM суммарные липиды в среде без сыворотки, 1 ч при 37°C). Затем клетки промывали DPBS, суспендировали раствором 0.02% EDTA (10 мин, 37°C) и анализировали на проточном цитометре.

Сравнение эффективности связывания липосом

Клетки на 24-луночных планшетах охлаждали на льду, промывали холодным DPBS и инкубировали с липосомами (без вектора или 2% мол. SiaLe^x, 50 μM суммарные липиды в среде без сыворотки, 1 ч на льду), затем промывали DPBS и инкубировали в полной среде еще 1 час при 37°C. После чего клетки промывали DPBS, суспендировали раствором 0.02% EDTA (10

мин, 37°C) и анализировали на проточном цитометре.

Суммарное накопление липосом

Суммарное накопление липосом с различным содержанием конъюгата SiaLe^x было изучено методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Анализ был проведен по описанной выше схеме (см. Проточная цитометрия и Конфокальная микроскопия); клетки инкубировали с липосомами 1 час при 37°C (50 µM суммарные липиды в среде без сыворотки). В случае появления нескольких целевых популяций на гистограммах распределения окраски клеток в канале FL1, анализировали популяцию с большим сигналом.

4.7. Оценка количества интернализированных и связанных с клеточной мембраной липосом с пролекарством мелфалана

Клетки HUVEC в 24-луночных планшетах активировали 10 нг/мл ФНО-α (4 ч, 37°C), затем инкубировали в среде без сыворотки (200 мкл, 30 мин, 37°C) при перемешивании, после чего среду заменяли раствором липосом (200 мкл 2% SiaLe^x или контрольные липосомы, 3 мМ по суммарным липидам с 2% мол. BODIPY-PC) и инкубировали при постоянном перемешивании 1 час при 37°C. Клетки затем отмывали PBS и обрабатывали 0.5 мл 0.05% трипсин/EDTA в течение 1 мин или 30 мин при 37°C. Кратковременная обработка монослоя клеток раствором трипсин/EDTA (1 мин), позволяет перевести клетки в суспензию и затем измерить общее количество липосом ассоциированных с клеткой, а длительная обработка (30 мин) снимает липосомы с поверхности клеток, что дает возможность, после центрифугирования, разделить липосомы связанные с поверхностью клетки (в супернатанте) и интернализированные (в осадке) липосомы. Из суспензии клеток после кратковременной обработки трипсином отбирали 400 мкл и солубилизировали 20 мкл 10% Triton X-100 и после УЗ обработки (30 мин) измеряли сигнал флуоресценции. Клетки после длительной обработки центрифугировали при 1000 g (4°C, 20 мин), чтобы разделить интернализированные липосомы (осадок, липосомы внутри клеток) и мембрано-связанные липосомы, которые после длительной трипсинизации переходят в раствор. После солубилизации Triton X-100, измеряли флуоресценцию BODIPY-PC в образцах на спектрофотометре Hitachi F4000 (кварцевая кювета, постоянное перемешивание, обе щели 5 нм, лех 490 нм, лем 506 нм). Для определения концентрации пролекарства в образцах строили калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции BODIPY-PC от концентрации липосом в растворе.

4.8. Внутриклеточное распределение SiaLe^X-липосом с пролекарством мелфалана

Клетки HUVEC первого пассажа на 4-е сутки после образования монослоя пересаживали на покровные стекла ($\sim 0.5 \times 10^6$ клеток/мл) предварительно покрытые 0.2% желатином. На следующие сутки клетки активировали 50 нг/мл ФНО- α (4 ч, 37°C), затем инкубировали с Hoechst 33342 (30 мин) для визуализации ядер, промывали DPBS и добавляли суспензию липосом (5 % мол. SiaLe^X, суммарная концентрация липидов 50 мкМ в среде без сыворотки). Для отслеживания ранних эндосом (метчик Trf), аппарата Гольджи и гликокаликса (WGA) и ЭПР (ER-tracker), коинкубацию с липосомами проводили 15 мин. Далее клетки промывали DPBS, фиксировали 1% PFA (15 мин, 37°C). Готовые препараты анализировали на конфокальном микроскопе.

4.9. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки SiaLe^X-липосом с пролекарством мелфалана

Для отслеживания процесса внутриклеточной разгрузки использовали 5%-SiaLe^X липосомы с двумя флуоресцентными метками — 1% мол. Rhod-PE и 80 мМ кальцеином (см. раздел 4.3).

Нормальные и активированные клетки HUVEC в 24-луночных планшетах (50 нг/мл ФНО- α , 4 ч, 37°C) промывали DPBS и инкубировали с липосомами (5 мол.% SiaLe^X или контрольные липосомы (без SiaLe^X), 50 мМ суммарные липиды) указанные промежутки времени при 37°C. Чтобы оценить сигнал от связавшихся, но не раскрытых липосом клетки инкубировали при 4°C. Затем клетки промывали холодным DPBS, обрабатывали раствором 0.02% EDTA и анализировали на проточном цитометре. До проведения измерений, клетки держали на льду. В случае конфокальной микроскопии клетки охлаждали до 4°C и инкубировали с липосомами (5 мол.% SiaLe^X, 50 мМ суммарные липиды) на льду 30 мин, затем отмывали DPBS и инкубировали определенное время при 37°C в полной ростовой среде. Клетки промывали и фиксировали 1% PFA 30 мин при 4°C.

4.10. Синтез флуоресцентного аналога липофильного пролекарства метотрексата

rac-1-(3-*трет*-бутоксикарбоксиамино)пропионил-глицерин (I)

В раствор изопропилиден-глицерида (2.07 ммоль) в 10 мл CH_3OH добавили 2.5 мл 1N раствор HCl . Реакция проводилась при перемешивании в течение 2 ч. Смесь разбавляли 25 мл эфира, промывали насыщенным раствором NaHCO_3 , а затем рассолом. Органический слой упарили. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (24 г, 60-200 мкм) в градиенте изопропилового спирта (от хлороформ-изопропиловый спирт- AcOH , 9.7:0.2:0.1 до хлф- $i\text{PrOH}$ - AcOH 8.9:1.0:0.1). Выход продукта (I) 200.4 мг (762 мкмоль). Суммарный выход двух стадий по ацетониду 38.5%. ТСХ (CHCl_3 - $i\text{PrOH}$ - AcOH , 9:1:0.1), $R_f = 0.29$. ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 1.44 (9H, с, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.57 (2H, т, $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.48 (2H, уш. м, $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.65 (1H, м, CH_2O), 3.72 (1H, м, CH_2O), 3.97 (1H, уш. м, CHO), 4.18 (1H, дд, CH_2OH), 4.26 (1H, дд, CH_2OH), 4.97 (1H, уш. м, NH).

13-BODIPY-тридекановая кислота (II)

Метилловый эфир 13-BODIPY-тридекановой кислоты 110 мг (232 мкмоль) растворяли в смеси $i\text{PrOH}$:0.5% KOH водн. 5:2 (65 и 26 мл соответственно) при перемешивании в течение 3.5 ч. Раствор упаривали, остаток растворяли в 10 мл воды, подкисляли 1 N HCl до pH 3-4. Экстрагировали CHCl_3 (2×3 мл), отделяли органический слой центрифугированием и упаривали. Получали 91 мг (198 мкмоль) (85%) кислоты (II). ТСХ (бензол-этилацетат- AcOH , 80:19:1), $R_f = 0.52$.

rac-1-[13-BODIPY-тридеcanoил]-3-(3-*трет*-бутоксикарбоксиамино)пропионил-глицерин (III)

В 15 мл CHCl_3 растворяли моноглицерид (I) (62.6 мг, 238 мкмоль), кислоту (II) (91.3 мг, 198 мкмоль). При перемешивании добавляли DMAP 29 мг (238 мкмоль), DCC 200 мкл (500 мкмоль) и 4-аминопиридин 25 мг (238 мкмоль). Реакцию вели 4.5 ч при комнатной температуре. Затем проводили гель-фильтрацию (в системе $\text{CH}_3\text{OH}-\text{CHCl}_3$, 1:1) для отделения от основной массы катализаторов и побочных продуктов. Остаток хроматографировали на силикагеле (7 г, 40-60 мкм) в градиенте этилацетата (толуол-этилацетат- AcOH 9.7:0.2:0.1 → 8.0:2.0:0.1). Получали 48 мг продукта, выход 35%. ТСХ (бензол-ЭА- AcOH 80:19:1), $R_f = 0,27$. ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3), δ , м.д.: 1.28, м, (12H, $(\text{CH}_2)_6$), 1.37, м, (2H, CH_2), 1.46, с, (9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.51, квинтет, (2H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.65, м, (4H, COCH_2CH_2 , CCH_2CH_2), 2.35, т, (2H, COCH_2), 2.43, с, (6H, $2*\text{C}(\text{CH}_3)$), 2.54, с, (6H, $2*\text{C}(\text{CH}_3)$), 2.57, т, (2H, $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 2.95, т, (2H, CCH_2), 3.48, д, (2H, $\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 4.03, с, (1H, CHOH), 4.18, уш.м., (2H, CH_2O), 4.21, дд, (1H, CH_2O), 4.26, дд,

(1H, CH₂O), 4.97, уш.м. (1H, NH), 6.06, с, (2H, аром. $\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{N}$). Масс-спектр: m/z 705 [M]⁺, 689 [M-F+3]⁺, 647 [M-Вос+K+3]⁺

рас-1-[13-BODIPY-тридеcanoил]-2-олеил-3-(3-трет-бутоксикарбоксиамино)пропионил-глицерин (IV)

В 4 мл CHCl₃ растворили (III) 46 мг (65 мкмоль), добавили олеиновую кислоту 30 мг (105 мкмоль), DMAP 8 мг (65 мкмоль), DCC 40 мкл (100 мкмоль) 2.55 н. раствора в CCl₄, 4-аминопиридин 7 мг (65 мкмоль). Реакцию проводили около 23 ч. при комнатной температуре. Продукт очищали гель-фильтрацией в смеси CH₃OH-CHCl₃ 1:1. Выход 58 мг (92%). ТСХ (бензол-ЭА-АсОН 80:19:1), $R_f = 0,66$. ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃), δ , м.д.: 0.90, м, (3H, CH₃), 1.28, м, (30H, (CH₂)₈, (CH₂)₆, CH₂), 1.46 с, (9H, C(CH₃)₃), 1.51, квинтет, (2H, CCH₂CH₂), 1.64, м, (8H, 2*COCH₂CH₂, 2* CCH₂CH₂CH₂), 2.03, м, (4H, CH₂CHCHCH₂), 2.34, м, (4H, 2*COCH₂), 2.43, с, (6H, 2*C(CH₃)), 2.54, с, (6H, 2*C(CH₃)), 2.56, т, (2H, NH-CH₂CH₂CO), 2.95, т, (2H, CCH₂), 3.44, д, (2H, NH-CH₂CH₂CO), 4.18, уш.м., (2H, CH₂O), 4.31, дд, (1H, CH₂O), 4.36, дд, (1H, CH₂O), 5.04, уш.м. (1H, NH), 5.28, м, (1H, CHO), 5.36, м, (2H, CH=CH), 6.06, с, (2H, аром. $\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{N}$). Масс-спектр: m/z 996 [M+Na+5]⁺, 862 [M-Вос-5]⁺.

рас-1-[13-BODIPY-тридеcanoил]-2-олеил-3-(3-аминопропионил)глицерин (V)

К 58 мг (60 мкмоль) соединения (IV) в 200 мкл толуола при постоянном помешивании при 0^oC приливали 2 мл TFA, выдерживали смесь 30 мин, затем дважды упаривали с добавлением толуола. Остаток хроматографировали на колонке с силикагелем (6 г, 40-60 мкм) в градиенте воды и метанола (CHCl₃-CH₃OH-H₂O-АсОН, от 96:2:0.15:1 до 93:7:0.5:1). Выход продукта (V) 15.7 мг (30%). ТСХ (CHCl₃-CH₃OH- H₂O-АсОН, 92:7:0.5:1), $R_f = 0,15$. ¹H-ЯМР-спектр (CDCl₃), δ , м.д.: 0.90, м, (3H, CH₃), 1.28, м, (30H, (CH₂)₈, (CH₂)₆, CH₂), 1.51, квинтет, (2H, CCH₂CH₂), 1.64, м, (8H, 2*COCH₂CH₂, 2* CCH₂CH₂CH₂), 2.03, м, (4H, CH₂CHCHCH₂), 2.34, м, (4H, 2*COCH₂), 2.43, с, (6H, 2*C(CH₃)), 2.54, с, (6H, 2*C(CH₃)), 2.92, м, (2H, 2H, NH₂-CH₂CH₂CO), 2.95, т, (2H, CCH₂), 3.44, д, (2H, NH₂-CH₂CH₂CO), 4.18, кв, (1H, CH₂O), 4.23, кв, (1H, CH₂O), 4.31, дд, (1H, CH₂O), 4.36, дд, (1H, CH₂O), 5.28, м, (1H, CHO), 5.36, м, (2H, CH=CH), 6.06, с, (2H, аром. $\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{N}$), 8.41, с, (2H, NH₂). УФ-спектр (этанол), λ_{max} , нм (ϵ): 498 (8.1 x 10⁴ M⁻¹ см⁻¹). Спектр флуоресценции: λ_{ex} 497 нм, λ_{em} 506 нм.

n-Нитрофеноксикарбонилметилметотрексат (VI)

Метотрексат предварительно освобождали от кристаллизационной воды высушиванием в течение 3.5 ч при P = 4 Па. К раствору 387.6 мг (852 мкмоль) метотрексата в 4 мл сухого DMSO прибавляли 280 мг (854 мкмоль) хорошо прокалённого Cs₂CO₃, перемешивали в течение 4 ч. К образовавшейся суспензии цезиевой соли МТХ прибавляли раствор 301.5 мг (982 мкмоль) йодацетата n-нитрофенола в 1 мл DMSO. Перемешивали ~30 мин. Побуревший раствор

замораживали для остановки реакции, частично лиофилизировали, остаток промывали эфиром (3×50 мл). Образовавшуюся вязкую коричневую массу высушивали в вакууме водоструйного насоса, затем растирали с 35 мл 1%-ного водного раствора уксусной кислоты. Полученную суспензию подкисляли 1н. HCl (150 мкл) до pH = 3, выдерживали в течение ночи при +4 °С и центрифугировали (~1500 g, 15 мин). Осадок промывали в холодной дистиллированной водой до pH = 5 и высаживали центрифугированием (процедуру повторяли 2 раза). Осадок замораживали и лиофилизировали.

Остаток растворяли в смеси хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (175:97:6:2.5), перемешивали на роторе, обрабатывали на УЗ-бане до мутно-опалесцирующей дисперсии и соупаривали с суспендированным целитом (10 г). Сухой остаток ресуспендировали в хлороформе и наносили на колонку с 70 г силикагеля (40 - 63 мкм) в хлороформе. Элюировали смесью хлороформ – метанол - уксусная кислота – вода 90:10:1:1, фракции по 250 мл: 85:15:1:1 – 200 мл, 80:20:1:1 – 250 мл, 75:25:1:1 ~ 1000 мл (основные фракции), 70:30:1:1 – дополнительно смывали (около 2 л). Фракции объединяли в три порции и упаривали. Получили 28,2, 23,1, 20 и 9 мг (1-я, 2-я, 3-я и 4-я порции, соответственно) продукта в виде аморфного желтого порошка, по данным ТСХ содержащего незначительное количество примесей. $R_f = 0.36$ (хлороформ-метанол-вода, 65:35:4). Суммарный выход 80.3 мг (15%). ^1H -ЯМР-спектр (d_6 -DMSO), δ , м.д.: 1.91, с, (2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.99, м, (1 H CH_2CHCO), 2.09, м, (1 H CH_2CHCO), 3.21, с, (3 H, NMe), 4.45, уш.с. (1H, NH-CH), 4.71, дд, (2 H, OCH_2CO), 4.78, с, (2 H, CH_2NMe), 6.58, уш. с, (2 H, NH_2), 6.79, д, (2 H, Ph), 7.39, с, (2H, Ph- NO_2), 7.63, уш. с, (2 H, NH_2), 7.73, д, (2 H, Ph), 7.63, с, (2H, Ph- NO_2), 8.32, д, (1 H, NH), 8.57, с, (1 H, H7 MTX).

[rac-1-(13-BODIPY-тридеканоил)-2-олеоил]глицеро-3-(β -аланил-N-карбонилметил)метотрексат (VII)

18.7 мг (VI) (29.5 мкмоль) растворяли в 500 мкл DMSO, добавляли к 13 мг (V) (13 мкмоль). При постоянном перемешивании добавляли 65 мкл TEA. Перемешивали в течение 24 ч, контролируя pH (~8). Замораживали смесь в жидком азоте и частично высушивали на лиофильной установке. Наносили остаток на колонку с сефадексом LH-20 (27 мл), уравновешенную системой хлороформ-метанол (1:1). После объединения и упаривания однородных фракций получали частично очищенный продукт, который очищали дополнительно на колонке с 3 г силикагеля (40 - 63 мкм), предварительно освобожденного от олигомеров, элюируя порциями системы хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода 98:2:1:0.5 – 18 мл, 96:4:1:1 – 15 мл, затем системами 90:10:2:1 и 85:15:2:1. Получено 4.7 мг (26%) в виде желто-зеленого аморфного вещества. $R_f = 0.82$ (хлороформ-метанол-вода, 65:25:4). ^1H -ЯМР-спектр (CDCl_3 : d_4 -MeOH, 1:1): 0.90, м, (3H, CH_3), 1.28, м, (38H, $(\text{CH}_2)_9$, $(\text{CH}_2)_6$, $(\text{CH}_2)_4$), 1.51, квинтет,

(2H, CON_2CH_2), 1.64, м, (2H, COCH_2CH_2 , 2H COCHCH_2), 1.97, с, (2 H, OCH_2CO), 2.01, м, (4H, $\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2$), 2.32, м, (4H, 2^*COCH_2), 2.43, с, (6H, $2^*\text{C}(\text{CH}_3)$), 2.47, с, (6H, $2^*\text{C}(\text{CH}_3)$), 2.53-2.66, м, (2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, 2H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 2.98, м, (2H, CCH_2), 3.22, м, (3H, NMe), 3.44 и 3.64, м, (2H, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.75, м, (1H, NHCHCO), 4.16, м, (2H, CH_2O), 4.33, м, (2H, CH_2O), 4.78, м, (2 H, CH_2NMe), 5.27, м, (1H, CHO), 5.32, м, (2H, $\text{CH}=\text{CH}$), 6.07, с, (2H, аром. $\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{N}$), 6.79, м, (2 H, Ph), 7.68, м, (1H, Ph), 7.73, м, (1 H, Ph), 7.81, м, (1H, NH, Glu), 8.57, с, (1 H, H7 MTX).

УФ-спектр конечного продукта (этанол), λ_{max} , нм (ϵ): 309 ($2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 372 ($0.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 498 ($8.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Спектр флуоресценции: $\lambda_{\text{возб}}$ 498 нм, $\lambda_{\text{эм}}$ 506 нм; $\lambda_{\text{макс}}$ 498 нм.

Квантовый выход (Q) для целевого продукта ($\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{эм}}$ 498 нм/506 нм) рассчитан по формуле:

$$Q = Q_R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{OD_R}{OD} = 0.636$$

где Q_R , I_R , OD_R – соответственно: квантовый выход, интеграл испускания и оптическое поглощение стандартного спиртового раствора родамина-6G. Значения интегралов испускания (I и I_R) получены с применением корректировочной функции использованного спектрофлуориметра (Hitachi F-4000, Япония).

4.11. Экспрессия фолатного рецептора опухолевыми клетками

Оценку нативного уровня экспрессии ФР- α проводили с помощью проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. За день до эксперимента клетки A549, CoLo 357 и MiaPaCa высаживали на 24-луночные планшеты, суспендировали 0.02% раствором EDTA, переносили в эппендорфы, центрифугировали 10 мин при 500 g , после чего ресуспендировали в полной ростовой среде. Инкубация с антителами к ФР- α (поликлональные антитела кролика к фолатному рецептору человека- α , разбавление 1:50, FL-257, Santa Cruz Biotechnology) проводили 1 ч при 4°C, затем клетки фиксировали 1% PFA при 4°C в течение ночи. Далее клетки промывали PBS/Triton X-100 (0.1%) и инкубировали с вторичными антителами (bovine anti-rabbit IgG-PE, sc-3750, разбавление 1:400) 2 ч при 4°C, после чего анализировали на проточном цитометре.

Для конфокальной микроскопии, клетки на покровных стеклах инкубировали с первичными антителами к ФР- α (разбавление 1:100) в течение часа при 37°C на шейкере, затем клетки отмывали PBS и фиксировали 1% PFA, 15 мин 37°C. Далее клетки промывали PBS и окрашивали вторичными антителами (bovine anti-rabbit IgG-PE, sc-3750, разбавление 1:400) в

течение часа при 37°C, после чего клетки отмывали PBS и готовые стекла анализировали на конфокальном микроскопе.

4.12. Накопление липосом с пролекарством метотрексата опухолевыми клетками

Для оценки накопления МТХ-липосом различными культурами клеток *in vitro*, в бислой липосом вводили BODIPY-меченный липид (BODIPY-PC). В качестве контроля использовали пустые липосомы (без пролекарства). Клетки A549, HEK-293, CoLo-357 и 3T3 высаживали на 24-луночные планшеты для получения конфлюэнтного монослоя. На следующий день культуральную среду заменяли суспензией липосом (100 μ M по суммарным липидам в среде без сыворотки) и инкубировали различные промежутки времени при 37°C. Затем клетки промывали PBS, суспендировали 0.02% EDTA (10 мин, 37°C) и анализировали на проточном цитометре.

Ингибирование связывания МТХ-липосом клетками A549 и CoLo-357 осуществляли обработкой клеток избытком свободного МТХ (100- и 1000-кратный избыток по отношению к концентрации МТХ-DG в липосомах), фолиевой кислоты (10-, 100-, 1000- и 2000-кратный избыток) или антителами к FR α (10 мкг/мл). Монослой клеток на 24-луночных планшетах обрабатывали свободным МТХ, фолиевой кислотой или антителами к FR α в течение часа при 37°C, после чего добавляли МТХ-липосомы (100 μ M суммарные липиды, 10 μ M МТХ-DG), предварительно промывая клетки буфером (режим последовательной инкубации) или без промывок (режим ко-инкубации). Через час инкубации клетки промывали PBS, суспендировали 0.02% EDTA (10 мин, 37°C) и анализировали на проточном цитометре.

Изучение механизма эндоцитоза МТХ-липосом клеткой проводили с использованием различных ингибиторов эндоцитоза и везикулярного транспорта. Максимальная концентрация ингибиторов предварительно была подобрана так, чтобы избежать токсического действия на клетки (менее 5% мертвых клеток в образце). В экспериментах использовали *нокодазол* (5 и 15 мкМ), *цитохалазин В* (2 и 5 мкг/мл), *колхицин* (30 мкМ) и *хлорпромазин* (20 и 40 мкМ). Монослой клеток (A549, CoLo 357, MCF-7, HT-29) в 24-луночных планшетах промывали PBS, инкубировали с ингибиторами в среде без сыворотки в течение часа (в случае хлорпромазина инкубации были сокращены до 5 мин) после чего добавляли липосомы (ко-инкубация в течение 1 ч при 37°C, 100 мкМ суммарные липиды). В опытах с хлорпромазином, до добавления липосом клетки дополнительно промывали PBS, поскольку этот ингибитор вызывает разрушение мембраны липосом и совместные инкубации с липосомами невозможны [72]. Кроме того, время инкубации было сокращено до 30 мин, поскольку действие хлорпромазина обратимо. В

качестве контроля выступали клетки без обработки ингибиторами, которые инкубировались с МТХ-липосомами 1 ч или 30 мин в среде без сыворотки. Перед измерением на проточном цитометре, клетки промывали PBS и суспендировали 0.02% EDTA.

4.13. Кинетика связывания и внутриклеточной разгрузки липосом с пролекарством метотрексата

Для отслеживания процесса внутриклеточной разгрузки использовали МТХ-липосомы с двумя флуоресцентными метками — 1% мол. Rhod-PE и 80 мМ кальцеин (см. раздел 4.3).

Клетки A549 или Colo-357 высаживали на 24-луночные планшеты для формирования монослоя. Затем клетки промывали от ростовой среды, охлаждали на льду (15 мин), добавляли липосомы в среде без сыворотки (100 мкМ суммарные липиды) и инкубировали указанные промежутки времени при 4°C или 37°C. После чего клетки промывали PBS, суспендировали раствором 0.02% EDTA и анализировали на проточном цитометре. До проведения измерений, клетки держали на льду.

4.14. Внутриклеточное распределение липофильного пролекарства метотрексата

Эксперименты по изучению внутриклеточного распределения МТХ-липосом проводили на клетках A549. За сутки до эксперимента клетки высаживали на прокровные стекла в концентрации $\sim 0.5 \times 10^6$ клеток/мл.

Для изучения **ранних стадий** взаимодействия липосом с клеткой были использованы трекеры внутриклеточных органелл и МТХ-липосомы несущие BODIPY-MXT-DG. Клетки окрашивали Hoechst 33342 для визуализации ядра (30 мин), затем промывали PBS и коинкубировали с трекерами и липосомами (100 мкМ суммарные липиды в среде без сыворотки, 30 мин при 37°C). Для трекера гликокаликса и аппарата Гольджи (лектин WGA, 10 мкг/мл) и эндоплазматического ретикула (ER-Tracker, ~ 1 мкМ) коникубации с липосомами проводили 30 мин. Для трекера ранних эндосом (конъюгат трансферрина, Trf, 20 мкг/мл), коникубации были сокращены до 15 мин. Перед фиксацией 1% PFA клетки промывали PBS.

После 1 ч и 3 ч инкубации клеток с МТХ-липосомами также проводили окрашивание ранних эндосом с помощью метчика Trf. За 15 мин до окончания инкубации, в среду добавляли Trf, после чего клетки фиксировали 1% PFA (15 мин, 37°C) и промывали PBS.

Внутриклеточную доставку МТХ-липосом за более длительные промежутки времени изучан **относительно ЭПР** на клетках A549 и 3T3. Для этого клетки сначала охлаждали до 4°C и затем

инкубировали с МТХ-липосомами на льду 1 час (100 мкМ липосомы несущие BODIPY-MXT-DG в среде без сыворотки). Такая обработка клеток позволяет синхронизировать процесс интернализации липосом, поскольку при 4°C липосомы лишь абсорбируются на поверхности клетки без интернализации. Все несвязавшиеся липосомы удаляли из среды промывкой холодным PBS, после чего проводили дальнейшие инкубации при 37°C различные промежутки времени в полной ростовой среде (30 мин, 2 ч, 4 ч и 22 ч). За 30 мин до конца инкубации клетки окрашивали трекером ЭПР и Hoechst 33342. Перед фиксацией 1% PFA, клетки промывали PBS.

Внутриклеточная локализация МТХ-липосом также была изучена относительно **белковых маркеров** аппарата Гольджи и ранних эндосом. Монослой клеток промывали от ростовой среды PBS, инкубировали с МТХ-липосомами 1 ч и 3 ч при 37°C (100 мкМ липосомы несущие BODIPY-MXT-DG в среде без сыворотки). Затем клетки фиксировали 1% PFA 15 мин при 37°C и пермеабелизировали 0.05% раствором сапонины в PBS, после чего инкубировали с белковыми маркерами 1 ч при 37°C (моноклональные антитела мыши к белку Golgin-97 человека, Thermofisher, A21270; 0,1 мг/мл PBS, 2 мМ N_3^- , 1% БСА, рабочая концентрация ~3 мкг/мл; антитела мыши к Early Endosome Antigen-1 (EEA-1), eBioscience, #14-9114; рабочая концентрация ~1 мкг/мл) и окрашивали Hoechst 33342 для визуализации ядра. После промывки 0.05% раствором сапонины в PBS клетки окрашивали вторичными антителами (1 ч при 37°C, конъюгат антител с Alexa-555 меткой, разведение 1:100).

Для оценки **внутриклеточной разгрузки** МТХ-липосом, в их состав вводили 1% мол. BODIPY-MXT-DG (флуоресцентный аналог пролекарства МТХ-DG, зеленый сигнал) и 1% мол. Rhod-PE (флуоресцентный аналог липидов матрицы липосом, красный сигнал). Клетки охлаждали до 4°C и затем инкубировали с липосомами на льду 30 мин (100 мкМ, среда без сыворотки). После чего клетки промывали холодным PBS и инкубировали в полной ростовой среде различные промежутки времени (10 мин, 30 мин, 1 ч, 1.5 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 20 ч). Перед фиксацией 1% PFA, клетки промывали PBS.

Готовые препараты анализировали на конфокальном микроскопе.

5. ВЫВОДЫ

- 1) Показано, что механизмы взаимодействия с клетками-мишенями наноразмерных липосом, сформированных на основе природных фосфолипидов и липофильных пролекарств, зависят от структуры лекарства, наличия на поверхности липосом специфического лиганда и типа клеток.
- 2) Установлено, что включение липофильного конъюгата лиганда селективных тетрасахарида SiaLe^x в состав липосом с липофильным пролекарством мелфалана (Mlph-DG), обеспечивает специфическое связывание липосом с эндотелиальными клетками, активированными провоспалительным цитокином.
- 3) Показано, что активированные клетки быстро (в течение минут) интернализуют связанные SiaLe^x-липосомы, при этом липосомы дестабилизируются, что свидетельствует о внутриклеточном высвобождении пролекарства.
- 4) Показано, что сродство SiaLe^x-липосом к активированным эндотелиальным клеткам увеличивается пропорционально количеству SiaLe^x-конъюгата в составе липосом. Неактивированные клетки связывают липосомы лишь незначительно, вне зависимости от наличия SiaLe^x-конъюгата. Таким образом реализуется потенциал направленного действия липосом на эндотелиальные клетки в очагах воспаления и опухоли.
- 5) Установлено, что включение липофильного пролекарства метотрексата (MTX-DG) в липосомы способствует их взаимодействию с опухолевыми клетками. Показано, что эндоцитоз липосом опухолевыми клетками осуществляется посредством нескольких механизмов, в том числе с помощью клатрин-независимого пути. Предполагается рецепторно-опосредованный механизм, но без участия фолатного рецептора и транспортера восстановленных фолатов.
- 6) С помощью синтезированного флуоресцентного аналога MTX-DG установлено, что липосомы после связывания с клеткой остаются на ее поверхности 1.5-2 ч и затем медленно интернализуются. Через 20 ч флуоресцентный аналог локализуется в околядерной области. Пролекарство и матричные липиды липосом поступают в клетку отдельно, то есть осуществляется внутриклеточная разгрузка липосом.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Елене Львовне Водовозовой за неоценимую помощь на всех этапах работы, чуткое руководство и оптимизм. Сердечную благодарность автор выражает всему коллективу лаборатории химии липидов ИБХ РАН, в особенности Ивану Болдыреву, Наталье Онищенко (Кузнецовой) и Дарье Третьяковой за поддержку и помощь в работе. Автор также благодарит Елену Викторовну Свирщевскую и всю лабораторию межклеточных взаимодействий ИБХ РАН за консультативную и деятельную помощь при проведении экспериментов и любезно предоставленный доступ к оборудованию. Автор благодарит Юлиана Георгиевича Молотковского за конструктивную критику и помощь в работе над текстом диссертации.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Barenholz, Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release.* 160 (2012) 117–134.
2. T.M. Allen, P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48.
3. D. Zucker, D. Marcus, Y. Barenholz, A. Goldblum, *Liposome drugs' loading efficiency: a working model based on loading conditions and drug's physicochemical properties.*, *J. Control. Release.* 139 (2009) 73–80.
4. S. Mura, D.T. Bui, P. Couvreur, J. Nicolas, *Lipid prodrug nanocarriers in cancer therapy*, *J. Control. Release.* 208 (2015) 25–41.
5. Е.Л. Водовозова, Н.Р. Кузнецова, В.А. Кадыков, С.С. Хуцян, Г.П. Гаенко, Ю.Г. Молотковский, *Липосомы как нано-носители липидных конъюгатов противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата*, *Рос. нанотехнологии.* 3 (2008) 162–172.
6. А.М. Козлов, Е.Ю. Корчагина, Е.Л. Водовозова, *Усиление противоопухолевой активности сарколизина путем превращения его в липидное производное и включения в мембрану липосом, содержащих углеводный вектор*, *Бюлл. эксп. биол. мед.* 123 (1997) 439–441.
7. E. Vodovozova, E. Moiseeva, G.K. Grechko, G.P. Gayenko, N.E. Nifant'ev, N.V. Bovin, J.G. Molotkovsky, *Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLeX, in a mouse mammary adenocarcinoma model*, *Eur. J. Cancer.* 36 (2000) 942–949.
8. N.R. Kuznetsova, E. V Stepanova, N.M. Peretolchina, D. a Khochenkov, I. a Boldyrev, N. V Bovin, E.L. Vodovozova, *Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand*, *J. Drug Target.* 22 (2014) 242–250.
9. N. Kuznetsova, A. Kandyba, I. Vostrov, V. Kadykov, G. Gaenko, J. Molotkovsky, E. Vodovozova, *Liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan as convenient drug delivery vehicles*, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 19 (2009) 51–59.
10. T.J. Anchordoquy, Y. Barenholz, D. Boraschi, M. Chorny, P. Decuzzi, M.A. Dobrovolskaia, Z.S. Farhangrazi, D. Farrell, A. Gabizon, H. Ghandehari, B. Godin, N.M. La-Beck, J. Ljubimova, S.M. Moghimi, L. Pagliaro, J.H. Park, D. Peer, E. Ruoslahti, N.J. Serkova, D. Simberg, *Mechanisms and Barriers in Cancer Nanomedicine: Addressing Challenges, Looking for Solutions*, *ACS Nano.* 11 (2017) 12–18.
11. X. Ma, N. Gong, L. Zhong, J. Sun, X.-J. Liang, *Future of nanotherapeutics: Targeting the cellular sub-organelles*, *Biomaterials.* 97 (2016) 10–21.
12. H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, *Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS*, *J. Control. Release.* 74 (2001) 47–61.

13. R.K. Jain, T. Stylianopoulos, Delivering nanomedicine to solid tumors, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7 (2010) 653–664.
14. T.P. Padera, A. Kadambi, E. di Tomaso, C.M. Carreira, E.B. Brown, Y. Boucher, N.C. Choi, D. Mathisen, J. Wain, E.J. Mark, L.L. Munn, R.K. Jain, Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics, *Science*. 296 (2002) 1883–1886.
15. R. Duncan, R. Gaspar, Nanomedicine(s) under the microscope., *Mol. Pharm.* 8 (2011) 2101–2141.
16. T. Ojha, V. Pathak, Y. Shi, W.E. Hennink, C.T.W. Moonen, G. Storm, F. Kiessling, T. Lammers, Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 119 (2017) 44–60.
17. T. Lammers, F. Kiessling, W.E. Hennink, G. Storm, Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress., *J. Control. Release*. 161 (2012) 175–187.
18. A.C. Anselmo, S. Mitragotri, Nanoparticles in the clinic, *Bioeng. Transl. Med.* 1 (2016) 10–29.
19. G.T. Noble, J.F. Stefanick, J.D. Ashley, T. Kiziltepe, B. Bilgicer, Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations, *Trends Biotechnol.* 32 (2014) 32–45.
20. G. Gregoriadis, B.E. Ryman, Fate of Protein-Containing Liposomes Injected into Rats. An Approach to the Treatment of Storage Diseases, *Eur. J. Biochem.* 24 (1972) 485–491.
21. T.D. Heath, J.A. Montgomery, J.R. Piper, D. Papahadjopoulos, Antibody-targeted liposomes: increase in specific toxicity of methotrexate-gamma-aspartate., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 (1983) 1377–1381.
22. A.L. Klibanov, K. Maruyama, V.P. Torchilin, L. Huang, Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes., *FEBS Lett.* 268 (1990) 235–237.
23. I. Ahmad, M. Longenecker, J. Samuel, T.M. Allen, Antibody-targeted Delivery of Doxorubicin Entrapped in Sterically Stabilized Liposomes Can Eradicate Lung Cancer in Mice Antibody-targeted Delivery of Doxorubicin Entrapped in Sterically Stabilized Liposomes Can Eradicate Lung Cancer in Mice¹, (1993) 1484–1488.
24. D.L. Iden, T.M. Allen, In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1513 (2001) 207–216.
25. D.B. Kirpotin, D.C. Drummond, Y. Shao, M.R. Shalaby, K. Hong, U.B. Nielsen, J.D. Marks, C.C. Benz, J.W. Park, Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models, *Cancer Res.* 66 (2006) 6732–6740.
26. C.W. Espelin, S.C. Leonard, E. Geretti, T.J. Wickham, B.S. Hendriks, Dual HER2 targeting with trastuzumab and liposomal-encapsulated doxorubicin (MM-302) demonstrates synergistic antitumor activity in breast and gastric cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 1517–1527.

27. W. Arap, Cancer Treatment by Targeted Drug Delivery to Tumor Vasculature in a Mouse Model, *Science* (80-.). 279 (1998) 377–380.
28. R. Lundmark, G.J. Doherty, M.T. Howes, K. Cortese, Y. Vallis, R.G. Parton, H.T. McMahon, The GTPase-activating protein GRAF1 regulates the CLIC/GEEC endocytic pathway., *Curr. Biol.* 18 (2008) 1802–1808.
29. C.D. Walkey, W.C.W. Chan, Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment., *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2780–2799.
30. D.B. Kirpotin, D.C. Drummond, Y. Shao, M.R. Shalaby, K. Hong, U.B. Nielsen, J.D. Marks, C.C. Benz, J.W. Park, Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models, *Cancer Res.* 66 (2006) 6732–6740.
31. J.W. Park, K. Hong, D.B. Kirpotin, G. Colbern, R. Shalaby, J. Baselga, Y. Shao, U.B. Nielsen, J.D. Marks, D. Moore, D. Papahadjopoulos, C.C. Benz, Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery., *Clin. Cancer Res.* 8 (2002) 1172–1181.
32. T.R. Daniels, E. Bernabeu, J.A. Rodríguez, S. Patel, M. Kozman, D.A. Chiappetta, E. Holler, J.Y. Ljubimova, G. Helguera, M.L. Penichet, The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer, *Biochim. Biophys. Acta.* 1820 (2012) 291–317.
33. S. Mazzucchelli, Targeted approaches for HER2 breast cancer therapy: News from nanomedicine?, *World J. Pharmacol.* 3 (2014) 72–85.
34. J.W. Park, D.B. Kirpotin, K. Hong, R. Shalaby, Y. Shao, U.B. Nielsen, J.D. Marks, D. Papahadjopoulos, C.C. Benz, Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes, *J. Control. Release.* 74 (2001) 95–113.
35. D.B. Kirpotin, D.C. Drummond, Y. Shao, M.R. Shalaby, K. Hong, U.B. Nielsen, J.D. Marks, C.C. Benz, J.W. Park, Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models, *Cancer Res.* 66 (2006) 6732–6740.
36. A.O. Elzoghby, W.M. Samy, N.A. Elgindy, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *J. Control. Release.* 157 (2012) 168–182.
37. B. Schmid, D.-E. Chung, A. Warnecke, I. Fichtner, F. Kratz, Albumin-binding prodrugs of camptothecin and doxorubicin with an Ala-Leu-Ala-Leu-linker that are cleaved by cathepsin B: synthesis and antitumor efficacy., *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 702–716.
38. E. Nogueira, A.C. Gomes, A. Preto, A. Cavaco-Paulo, Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12 (2016) 1113–1126.
39. X.Q. Pan, Strategy for the treatment of acute myelogenous leukemia based on folate receptor beta -targeted liposomal doxorubicin combined with receptor induction using all-trans retinoic acid, *Blood.* 100 (2002) 594–602.

40. R. Lee, P. Low, Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 3198-3204.
41. A. Jain, K. Jain, P. Kesharwani, N.K. Jain, Low density lipoproteins mediated nanoplatfoms for cancer targeting, *J. Nanoparticle Res.* 15 (2013) 1888–1926.
42. A.M. Master, A. Sen Gupta, EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment, *Nanomedicine.* 7 (2012) 1895–1906.
43. A. Lange, L.M. McLane, R.E. Mills, S.E. Devine, A.H. Corbett, Expanding the definition of the classical bipartite nuclear localization signal, *Traffic.* 11 (2010) 311–323.
44. A. Battigelli, J. Russier, E. Venturelli, C. Fabbro, V. Petronilli, P. Bernardi, T. Da Ros, M. Prato, A. Bianco, Peptide-based carbon nanotubes for mitochondrial targeting, *Nanoscale.* 5 (2013) 9110–9117.
45. S. Pollock, R. Antrobus, L. Newton, B. Kampa, J. Rossa, S. Latham, N.B. Nichita, R. a Dwek, N. Zitzmann, Uptake and trafficking of liposomes to the endoplasmic reticulum., *FASEB J.* 24 (2010) 1866–1878.
46. N.M. Sakhrani, H. Padh, Organelle targeting: Third level of drug targeting, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 585–599.
47. A.R. Maity, D. Stepensky, Delivery of drugs to intracellular organelles using drug delivery systems: Analysis of research trends and targeting efficiencies, *Int. J. Pharm.* 496 (2015) 268–274.
48. M. Kristensen, D. Birch, H.M. Nielsen, Applications and challenges for use of cell-penetrating peptides as delivery vectors for peptide and protein cargos, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 185–202.
49. M. Kawano, M. Matsui, H. Handa, SV40 virus-like particles as an effective delivery system and its application to a vaccine carrier., *Expert Rev. Vaccines.* 12 (2013) 199–210.
50. A.I. Aronsohn, J.A. Hughes, Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposome-mediated gene therapy., *J. Drug Target.* 5 (1998) 163–169.
51. S. V. Boddapati, G.G.M. D'Souza, S. Erdogan, V.P. Torchilin, V. Weissig, Organelle-Targeted Nanocarriers: Specific Delivery of Liposomal Ceramide to Mitochondria Enhances Its Cytotoxicity in Vitro and in Vivo, *Nano Lett.* 8 (2008) 2559–2563.
52. C.M. Paleos, D. Tsiourvas, Z. Sideratou, Triphenylphosphonium decorated liposomes and dendritic polymers: Prospective second generation drug delivery systems for targeting mitochondria, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 2233–2241.
53. K.L. Horton, K.M. Stewart, S.B. Fonseca, Q. Guo, S.O. Kelley, Mitochondria-Penetrating Peptides, *Chem. Biol.* 15 (2008) 375–382.
54. D. Wlodkowic, J. Skommer, D. McGuinness, C. Hillier, Z. Darzynkiewicz, ER-Golgi network-A future target for anti-cancer therapy, *Leuk. Res.* 33 (2009) 1440–1447.
55. J. Wang, X. Fang, W. Liang, Pegylated Phospholipid Micelles Induce Endoplasmic Reticulum-

- Dependent Apoptosis of Cancer Cells but not Normal Cells, *ACS Nano*. 6 (2012) 5018–5030.
56. J.A. Leifert, M.P. Rodriguez-Carreno, F. Rodriguez, J.L. Whitton, Targeting plasmid-encoded proteins to the antigen presentation pathways, *Immunol. Rev.* 199 (2004) 40–53.
 57. C. Staudt, E. Puissant, M. Boonen, Subcellular Trafficking of Mammalian Lysosomal Proteins: An Extended View, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2016) 47–72.
 58. J. Behnke, E.-L. Eskelinen, P. Saftig, B. Schröder, Two dileucine motifs mediate late endosomal/lysosomal targeting of transmembrane protein 192 (TMEM192) and a C-terminal cysteine residue is responsible for disulfide bond formation in TMEM192 homodimers, *Biochem. J.* 434 (2011) 219–231.
 59. M. Dominska, D.M. Dykxhoorn, Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 1183–1189.
 60. A.R. Klemm, D. Young, J.B. Lloyd, Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability, *Biochem. Pharmacol.* 56 (1998) 41–46.
 61. G.J. Doherty, H.T. McMahon, Mechanisms of endocytosis., *Annu. Rev. Biochem.* 78 (2009) 857–902.
 62. M. Marsh, A. Helenius, Virus entry: open sesame., *Cell.* 124 (2006) 729–40.
 63. L. Pelkmans, A. Helenius, Insider information: what viruses tell us about endocytosis, *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (2003) 414–422.
 64. I. Canton, G. Battaglia, Endocytosis at the nanoscale., *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2718–39.
 65. P. Saftig, J. Klumperman, Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 623–35.
 66. J.E. DiCiccio, B.E. Steinberg, Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification., *J. Gen. Physiol.* 137 (2011) 385–90.
 67. K. Unfried, C. Albrecht, L.-O. Klotz, A. Von Mikecz, S. Grether-Beck, R.P.F. Schins, Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms, *Nanotoxicology.* 1 (2007) 52–71.
 68. E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, M.J. Sailor, Targeting of drugs and nanoparticles to tumors., *J. Cell Biol.* 188 (2010) 759–68.
 69. M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K.A. Dawson, Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 14265–70.
 70. M. Bretscher, Endocytosis: relation to capping and cell locomotion, *Science.* 224 (1984) 681–686.
 71. G. Griffiths, R. Back, M. Marsh, A quantitative analysis of the endocytic pathway in baby hamster kidney cells., *J. Cell Biol.* 109 (1989) 2703–2720.
 72. U.S. Huth, R. Schubert, R. Peschka-Süss, Investigating the uptake and intracellular fate of pH-

- sensitive liposomes by flow cytometry and spectral bio-imaging., *J. Control. Release.* 110 (2006) 490–504.
73. K. Kettler, K. Veltman, D. van de Meent, A. van Wezel, a J. Hendriks, Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type., *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (2014) 481–92.
 74. E. Ghigo, J. Kartenbeck, P. Lien, L. Pelkmans, C. Capo, J.-L. Mege, D. Raoult, Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis., *PLoS Pathog.* 4 (2008) e1000087.
 75. H.C. Fischer, T.S. Hauck, A. Gómez-Aristizábal, W.C.W. Chan, Exploring primary liver macrophages for studying quantum dot interactions with biological systems., *Adv. Mater.* 22 (2010) 2520–4.
 76. A. França, P. Aggarwal, E. V Barsov, S. V Kozlov, M.A. Dobrovolskaia, Á. González-Fernández, Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro., *Nanomedicine (Lond).* 6 (2011) 1175–88.
 77. J. Park, D.-H. Lim, H.-J. Lim, T. Kwon, J. Choi, S. Jeong, I.-H. Choi, J. Cheon, Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles., *Chem. Commun. (Camb).* 47 (2011) 4382–4.
 78. O. Lunov, T. Syrovets, C. Loos, J. Beil, M. Delacher, K. Tron, G.U. Nienhaus, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, T. Simmet, Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line., *ACS Nano.* 5 (2011) 1657–69.
 79. D. Vercauteren, R.E. Vandenbroucke, A.T. Jones, J. Rejman, J. Demeester, S.C. De Smedt, N.N. Sanders, K. Braeckmans, The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls., *Mol. Ther.* 18 (2010) 561–9.
 80. R. Lipowsky, H. Döbereiner, Vesicles in contact with nanoparticles and colloids, *EPL Europhysics Lett.* 43 (1998) 219–225.
 81. O. Le Bihan, P. Bonnafous, L. Marak, T. Bickel, S. Trépout, S. Mornet, F. De Haas, H. Talbot, J.-C. Taveau, O. Lambert, Cryo-electron tomography of nanoparticle transmigration into liposome., *J. Struct. Biol.* 168 (2009) 419–25.
 82. S.K. Banerji, M.A. Hayes, Examination of nonendocytotic bulk transport of nanoparticles across phospholipid membranes., *Langmuir.* 23 (2007) 3305–13.
 83. S. Zhang, J. Li, G. Lykotrafitis, G. Bao, S. Suresh, Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles., *Adv. Mater.* 21 (2009) 419–424.
 84. A. Chaudhuri, G. Battaglia, R. Golestanian, The effect of interactions on the cellular uptake of nanoparticles, *Phys. Biol.* 8 (2011) 46002.
 85. J. Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis., *Biochem. J.* 377 (2004) 159–169.

86. C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles., *Biomaterials*. 31 (2010) 3657–3666.
87. W. Jiang, B.Y.S. Kim, J.T. Rutka, W.C.W. Chan, Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent., *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 145–150.
88. F. Lu, S.-H. Wu, Y. Hung, C.-Y. Mou, Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles., *Small*. 5 (2009) 1408–1413.
89. J.A. Champion, S. Mitragotri, Role of target geometry in phagocytosis., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 4930–4934.
90. S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus, J.C. Luft, V.J. Madden, M.E. Napier, J.M. DeSimone, The effect of particle design on cellular internalization pathways., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 11613–11618.
91. B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells., *Nano Lett.* 6 (2006) 662–668.
92. B.D. Chithrani, W.C.W. Chan, Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes., *Nano Lett.* 7 (2007) 1542–1550.
93. H. Jin, D. a Heller, R. Sharma, M.S. Strano, Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles., *ACS Nano*. 3 (2009) 149–158.
94. T. Xia, M. Kovichich, M. Liong, J.I. Zink, A.E. Nel, Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways., *ACS Nano*. 2 (2008) 85–96.
95. X. Banquy, F. Suarez, A. Argaw, J.-M. Rabanel, P. Grutter, J.-F. Bouchard, P. Hildgen, S. Giasson, Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake, *Soft Matter*. 5 (2009) 3984–3991.
96. K.A. Mislick, J.D. Baldeschwieler, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 12349–12354.
97. T.M. Allen, G.A. Austin, A. Chonn, L. Lin, K.C. Lee, Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1061 (1991) 56–64.
98. M.R. Lorenz, V. Holzapfel, A. Musyanovych, K. Nothelfer, P. Walther, H. Frank, K. Landfester, H. Schrezenmeier, V. Mailänder, Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells., *Biomaterials*. 27 (2006) 2820–2828.
99. C. Hunter, S.M. Moghimi, Cationic carriers of genetic material and cell death: a mitochondrial tale., *Biochim. Biophys. Acta*. 1797 (2010) 1203–1209.
100. A. Albanese, W.C.W. Chan, Effect of gold nanoparticle aggregation on cell uptake and toxicity., *ACS Nano*. 5 (2011) 5478–5489.

101. A. Lesniak, A. Campbell, M.P. Monopoli, I. Lynch, A. Salvati, K.A. Dawson, Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake., *Biomaterials*. 31 (2010) 9511–9518.
102. C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, Polysaccharide-decorated nanoparticles., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 327–341.
103. J. Huang, L. Bu, J. Xie, K. Chen, Z. Cheng, X. Li, X. Chen, Effects of nanoparticle size on cellular uptake and liver MRI with polyvinylpyrrolidone-coated iron oxide nanoparticles., *ACS Nano*. 4 (2010) 7151–7160.
104. D.A. Barrett, M.S. Hartshorne, M.A. Hussain, P.N. Shaw, M.C. Davies, Resistance to Nonspecific Protein Adsorption by Poly(vinyl alcohol) Thin Films Adsorbed to a Poly(styrene) Support Matrix Studied Using Surface Plasmon Resonance, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5232–5239.
105. A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J.-P. Benoit, Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems., *Biomaterials*. 27 (2006) 4356–4373.
106. A.N. Ilinskaya, M.A. Dobrovolskaia, Understanding the immunogenicity and antigenicity of nanomaterials: Past, present and future, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 299 (2016) 70–77.
107. J. Szebeni, F. Muggia, A. Gabizon, Y. Barenholz, Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 1020–1030.
108. E. Jubeli, L. Moine, J. Vergnaud-Gauduchon, G. Barratt, E-selectin as a target for drug delivery and molecular imaging., *J. Control. Release*. 158 (2012) 194–206.
109. M.P. Bevilacqua, S. Stengelin, M.A. Gimbrone, B. Seed, Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins., *Science*. 243 (1989) 1160–1165.
110. E.J. von Asmuth, E.F. Smeets, L.A. Ginsel, J.J. Onderwater, J.F. Leeuwenberg, W.A. Buurman, Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells., *Eur. J. Immunol.* 22 (1992) 2519–2526.
111. P.I. Chuang, B.A. Young, R.R. Thiagarajan, C. Cornejo, R.K. Winn, J.M. Harlan, Cytoplasmic domain of E-selectin contains a non-tyrosine endocytosis signal, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 24813–24818.
112. L.S.-L. Cheung, P.S. Raman, E.M. Balzer, D. Wirtz, K. Konstantopoulos, Biophysics of selectin-ligand interactions in inflammation and cancer, *Phys. Biol.* 8 (2011) 015013.
113. S. Köhler, S. Ullrich, U. Richter, U. Schumacher, E-/P-selectins and colon carcinoma metastasis: first in vivo evidence for their crucial role in a clinically relevant model of spontaneous metastasis formation in the lung., *Br. J. Cancer*. 102 (2010) 602–9.
114. A. Varki, Selectin ligands: will the real ones please stand up?, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 158–162.

115. B.T. Marshall, M. Long, J.W. Piper, T. Yago, R.P. McEver, C. Zhu, Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules., *Nature*. 423 (2003) 190–193.
116. J. Kusunose, H. Zhang, M.K.J. Gagnon, T. Pan, S.I. Simon, K.W. Ferrara, Microfluidic system for facilitated quantification of nanoparticle accumulation to cells under laminar flow., *Ann. Biomed. Eng.* 41 (2013) 89–99.
117. C. Foxall, S.R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. a Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa, B.K. Brandley, The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide., *J. Cell Biol.* 117 (1992) 895–902.
118. A.M. Wayman, W. Chen, R.P. McEver, C. Zhu, Triphasic force dependence of E-selectin/ligand dissociation governs cell rolling under flow, *Biophys. J.* 99 (2010) 1166–1174.
119. R.C. Preston, R.P. Jakob, F.P.C. Binder, C.P. Sager, B. Ernst, T. Maier, E-selectin ligand complexes adopt an extended high-affinity conformation, *J. Mol. Cell Biol.* 8 (2016) 62–72.
120. G. Bendas, a Krause, U. Bakowsky, J. Vogel, U. Rothe, Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique., *Int. J. Pharm.* 181 (1999) 79–93.
121. R.C. Gunawan, D.T. Auguste, The role of antibody synergy and membrane fluidity in the vascular targeting of immunoliposomes., *Biomaterials*. 31 (2010) 900–907.
122. G. Bendas, a Krause, R. Schmidt, J. Vogel, U. Rothe, Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery. A potential way of anti-inflammatory therapy., *Pharm. Acta Helv.* 73 (1998) 19–26.
123. D.D. Spragg, D.R. Alford, R. Greferath, C.E. Larsen, K.D. Lee, G.C. Gurtner, M.I. Cybulsky, P.F. Tosi, C. Nicolau, M. a Gimbrone, Immunotargeting of liposomes to activated vascular endothelial cells: a strategy for site-selective delivery in the cardiovascular system., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (1997) 8795–8800.
124. T. Murohara, J. Margiotta, L.M. Phillips, J.C. Paulson, S. DeFrees, S. Zalipsky, L.S.S. Guo, A.M. Lefer, Cardioprotection by liposome-conjugated sialyl Lewisx-oligosaccharide in myocardial ischaemia and reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 30 (1995) 965–974.
125. S.A. DeFrees, L. Phillips, L. Guo, S. Zalipsky, Sialyl Lewis x Liposomes as a Multivalent Ligand and Inhibitor of E-Selectin Mediated Cellular Adhesion, *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 6101–6104.
126. R. Zeisig, R. Stahn, K. Wenzel, D. Behrens, I. Fichtner, Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumour cell adhesion in vitro, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1660 (2004) 31–40.
127. M. Hirai, H. Minematsu, N. Kondo, K. Oie, K. Igarashi, N. Yamazaki, Accumulation of liposome with Sialyl Lewis X to inflammation and tumor region: application to in vivo bio-imaging., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007) 553–558.

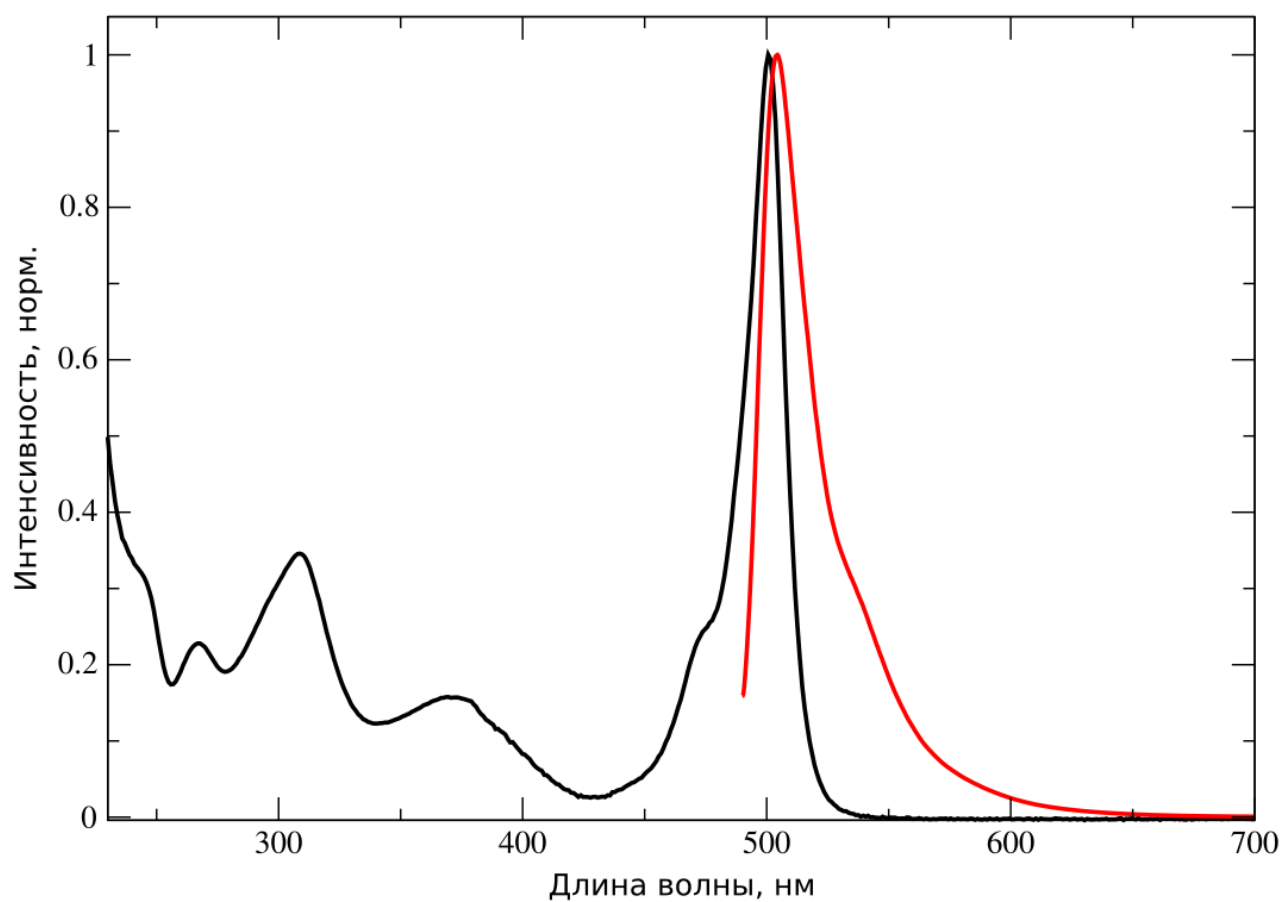
128. N. Hashida, N. Ohguro, N. Yamazaki, Y. Arakawa, E. Oiki, H. Mashimo, N. Kurokawa, Y. Tano, High-efficacy site-directed drug delivery system using sialyl-Lewis X conjugated liposome., *Exp. Eye Res.* 86 (2008) 138–149.
129. W. Tsuruta, H. Tsurushima, T. Yamamoto, K. Suzuki, N. Yamazaki, A. Matsumura, Application of liposomes incorporating doxorubicin with sialyl Lewis X to prevent stenosis after rat carotid artery injury., *Biomaterials.* 30 (2009) 118–125.
130. A. Maehara, K. Nishida, M. Furutani, E. Matsumoto, A. Ohtsuka, Y. Ninomiya, T. Oohashi, Light and electron microscopic detection of inflammation-targeting liposomes encapsulating high-density colloidal gold in arthritic mice., *Inflamm. Res.* 63 (2014) 139–147.
131. R. Stahn, C. Grittner, R. Zeisig, U. Karsten, S.B. Felix, K. Wenzel, Sialyl Lewis(x)-liposomes as vehicles for site-directed, E-selectin-mediated drug transfer into activated endothelial cells., *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2001) 141–147.
132. E.L. Vodovozova, G. V. Pazynina, N. V. Bovin, Synthesis of diglyceride conjugate of selectin ligand SiaLeX as a vector for targeting of drug-loaded liposomes, *Mendeleev Commun.* 21 (2011) 69–71.
133. H.F. Galley, M.G. Blaylock, a M. Dubbels, N.R. Webster, Variability in E-selectin expression, mRNA levels and sE-selectin release between endothelial cell lines and primary endothelial cells., *Cell Biol. Int.* 24 (2000) 91–99.
134. D. Chappell, M. Jacob, O. Paul, M. Rehm, U. Welsch, M. Stoeckelhuber, P. Conzen, B.F. Becker, The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: an impressive structure *ex vivo* but not in culture., *Circ. Res.* 104 (2009) 1313–1317.
135. Н.Н. Склянкина, Н.В. Болдырева, О.Н. Щегловитова, Различия в функциональной активности культивируемых клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, полученных от разных доноров, *Цитология.* 53 (2011) 341–346.
136. P.S. Kowalski, L.L. Lintermans, H.W.M. Morselt, N.G.J. Leus, M.H.J. Ruiters, G. Molema, J. a a M. Kamps, Anti-VCAM-1 and anti-E-selectin SAINT-O-Somes for selective delivery of siRNA into inflammation-activated primary endothelial cells., *Mol. Pharm.* 10 (2013) 3033–3044.
137. P.S. Kowalski, P.R. Kuninty, K.T. Bijlsma, M.C.A. Stuart, N.G.J. Leus, M.H.J. Ruiters, G. Molema, J.A.A.M. Kamps, SAINT-liposome-polycation particles, a new carrier for improved delivery of siRNAs to inflamed endothelial cells, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 89 (2015) 40–47.
138. Y. Li, J. Wang, Y. Gao, J. Zhu, M.G. Wientjes, J.L.-S. Au, Relationships between liposome properties, cell membrane binding, intracellular processing, and intracellular bioavailability., *AAPS J.* 13 (2011) 585–597.
139. S. Kessner, A. Krause, U. Rothe, G. Bendas, Investigation of the cellular uptake of E-Selectin-targeted immunoliposomes by activated human endothelial cells., *Biochim. Biophys. Acta.* 1514 (2001) 177–190.

140. H. Setiadi, R.P. McEver, Clustering endothelial E-selectin in clathrin-coated pits and lipid rafts enhances leukocyte adhesion under flow., *Blood*. 111 (2008) 1989–7998.
141. L. Johannes, C. Lamaze, Clathrin-Dependent or Not: Is It Still the Question?, *Traffic*. 3 (2002) 443–451.
142. V. Slepishkin, S. Simões, P. Dazin, Sterically Stabilized pH-sensitive liposomes intracellular delivery of aqueous contents and prolonged circulation in vivo, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 2382–2388.
143. P.L. Tuna, A.L. Hubbard, Transcytosis: Crossing Cellular Barriers, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 871–932.
144. A. Antony, The biological chemistry of folate receptors, *Blood*. 79 (1992) 2807–2820.
145. A.L. Jackman, D.S. Theti, D.D. Gibbs, Antifolates targeted specifically to the folate receptor, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1111–1125.
146. W. Xin, S. Feng, J.H. Freisheim, L.E. Gentry, M. Ratnam, Differential stereospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates, *Biochem. Pharmacol.* 44 (1992) 1898–1901.
147. J.F. Ross, P.K. Chaudhuri, M. Ratnam, Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications, *Cancer*. 73 (1994) 2432–2443.
148. M. Wu, W. Gunning, M. Ratnam, Expression of folate receptor type alpha in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8 (1999) 775–782.
149. R.J. Lee, S. Shivakumar, Folate Receptor Targeted Liposomes, *Liposome Technol.* (2006) 171–186.
150. C.P. Leamon, A.L. Jackman, Exploitation of the folate receptor in the management of cancer and inflammatory disease., *Vitam. Horm.* 79 (2008) 203–233.
151. A. Gabizon, D. Tzemach, J. Gorin, L. Mak, Y. Amitay, H. Shmeeda, S. Zalipsky, Improved therapeutic activity of folate-targeted liposomal doxorubicin in folate receptor-expressing tumor models, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 43–52.
152. G.R. Westerhof, J.H. Schornagel, I. Kathmann, a L. Jackman, a Rosowsky, R. a Forsch, J.B. Hynes, F.T. Boyle, G.J. Peters, H.M. Pinedo, Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity., *Mol. Pharmacol.* 48 (1995) 459–471.
153. N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M. Zhang, Methotrexate-Modified Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells, *Langmuir*. 21 (2005) 8858–8864.
154. T.P. Thomas, M. Joice, M. Sumit, J.E. Silpe, A. Kotlyar, S. Bharathi, J. Kukowska-Latallo, J.R.

- Baker, S.K. Choi, Design and in vitro validation of multivalent dendrimer methotrexates as a folate-targeting anticancer therapeutic., *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 6594–6605.
155. K. Hashimoto, J.E. Loader, M.S. Knight, S.C. Kinsky, Inhibition of cell proliferation and dihydrofolate reductase by liposomes containing methotrexate-dimyristoylphosphatidylethanolamine derivatives and by the glycerophosphorylethanolamine analogs, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 816 (1985) 169–178.
156. S.S. Abolmaali, A.M. Tamaddon, R. Dinarvand, A review of therapeutic challenges and achievements of methotrexate delivery systems for treatment of cancer and rheumatoid arthritis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71 (2013) 1115–1130.
157. Z.A. Khan, R. Tripathi, B. Mishra, Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 151–169.
158. E. Nogueira, F. Lager, D. Le Roux, P. Nogueira, J. Freitas, C. Charvet, G. Renault, A. Loureiro, C.R. Almeida, A. Ohradanova-Repic, C. Machacek, G.J.L. Bernardes, A. Moreira, H. Stockinger, M. Burnet, A.M. Carmo, A.C. Gomes, A. Preto, G. Bismuth, A. Cavaco-Paulo, Enhancing methotrexate tolerance with folate tagged liposomes in arthritic mice, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 2243–2252.
159. Е.Л. Водовозова, Г.П. Гаенко, Е.С. Бобрикова, Г.В. Пазынина, Ю.Г. Молотковский, Диглицеридное производное метотрексата: синтез и цитотоксическая активность в составе адресных липосом, *Хим.-Фарм. Журн.* 41 (2007) 10–14.
160. X. Zheng, D. Xing, F. Zhou, B. Wu, W.R. Chen, Indocyanine green-containing nanostructure as near infrared dual-functional targeting probes for optical imaging and photothermal therapy, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 447–456.
161. J.A. Reddy, E. Westrick, H.K.R. Santhapuram, S.J. Howard, M.L. Miller, M. Vetzal, I. Vlahov, R.V.J. Chari, V.S. Goldmacher, C.P. Leamon, Folate receptor-specific antitumor activity of EC131, a folate-maytansinoid conjugate, *Cancer Res.* 67 (2007) 6376–6382.
162. E. Mornet, N. Carmoy, C. Lainé, L. Lemiègre, T. Le Gall, I. Laurent, R. Marianowski, C. Férec, P. Lehn, T. Benvegnu, T. Montier, Folate-equipped nanolipoplexes mediated efficient gene transfer into human epithelial cells., *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1477–1501.
163. N.R. Kuznetsova, C. Sevrin, D. Lespineux, N. V Bovin, E.L. Vodovozova, T. Mészáros, J. Szebeni, C. Grandfils, Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer., *J. Control. Release.* 160 (2012) 394–400.
164. U. Huth, R. Schubert, Spectral Imaging for the Investigation of the Intracellular Fate of Liposomes, *Liposome Technol.* 2 (2006) 341–381.
165. D. Dutta, J.G. Donaldson, Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences., *Cell. Logist.* 2 (2012) 203–208.
166. M.T. Howes, S. Mayor, R.G. Parton, Molecules, mechanisms, and cellular roles of clathrin-independent endocytosis., *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (2010) 519–527.

167. I.A. Boldyrev, X. Zhai, M.M. Momsen, H.L. Brockman, R.E. Brown, J.G. Molotkovsky, New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes, *J. Lipid Res.* 48 (2007) 1518–1532.
168. E.L. Vodovozova, D. V. Evdokimov, J.G. Molotkovsky, Synthesis of a lipid derivative of the antitumor agent methotrexate, *Russ. J. Bioorganic Chem.* 30 (2004) 599–601.
169. W. Srisiri, H.G. Lamparski, D.F. O'Brien, Syntheses of Polymerizable Monoacylglycerols and 1,2-Diacyl- sn -glycerols, *J. Org. Chem.* 61 (1996) 5911–5915.
170. Y. Leblanc, B.J. Fitzsimmons, J. Adams, F. Perez, J. Rokach, The total synthesis of 12-HETE and 12,20-DiHETE, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 789–793.
171. A. Ichihara, M. Ubukata, S. Sakamura, Stereoselective synthesis of (\pm)-palitantin, *Tetrahedron.* 36 (1980) 1547–1550.
172. E.L. Vodovozova, J.G. Molotkovsky, A novel catalyst for O-acylation in lipid chemistry, *Tetrahedron Lett.* 35 (1994) 1933–1936.
173. J.P. Vos, M. Luisa Giudici, L.M.G. van Golde, A. Preti, S. Marchesini, M. Lopes-Cardozo, Cultured oligodendrocytes metabolize a fluorescent analogue of sulphatide; inhibition by monensin, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1126 (1992) 269–276.
174. E. Monti, A. Preti, A. Novati, M.F. Aleo, M.L. Clemente, S. Marchesini, Uptake and metabolism of a fluorescent sulfatide analogue in cultured skin fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta/Lipids Lipid Metab.* 1124 (1992) 80–87.
175. N. Sarvazyan, L. Swift, R. Martinez-Zaguilan, Effects of oxidants on properties of fluorescent calcium indicators., *Arch. Biochem. Biophys.* 350 (1998) 132–136.
176. A. Ciechanover, A.L. Schwartz, H.F. Lodish, Sorting and recycling of cell surface receptors and endocytosed ligands: The asialoglycoprotein and transferrin receptors, *J. Cell. Biochem.* 23 (1983) 107–130.
177. Л.Д. Бергельсон, Э.В. Дятловитская, Ю.Г. Молотковский и др., *Препаративная биохимия липидов*, М.: Наука, 1981, 256 стр.
178. E.A. Jaffe, R.L. Nachman, C.G. Becker, C.R. Minick, Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria., *J. Clin. Invest.* 52 (1973) 2745–56. doi:10.1172/JCI107470.

Приложение 1



Спектры оптического поглощения (черный) и испускания флуоресценции (красный) BODIPY-MTX-DG (VII). Для наглядности, сигнал нормирован на интенсивность в максимуме. Раствор в этаноле.