

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

на правах рукописи



Кузнецова Наталья Ростиславовна

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ДИГЛИЦЕРИДНЫМИ
КОНЬЮГАТАМИ МЕТОТРЕКСАТА И МЕЛФАЛАНА: ИЗУЧЕНИЕ
СТАБИЛЬНОСТИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С КОМПОНЕНТАМИ КРОВИ**

Специальность 03.01.04 - Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в лаборатории химии липидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научный руководитель: доктор химических наук,
Водовозова Елена Львовна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Торховская Татьяна Ивановна

кандидат химических наук,
доцент,
Барсуков Леонид Иванович

Ведущая организация: Химический факультет
Московского государственного
университета им. М.В. Ломоносова

Защита состоится « 16 » мая 2012 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН по адресу:
117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Автореферат разослан « 16 » апреля 2012 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Применение липосом в качестве систем доставки лекарств сегодня является признанным подходом к повышению эффективности лечения. Включение лекарств в состав липосом способствует повышению переносимости инкапсулированного препарата пациентом, а также позволяет увеличить терапевтический индекс (соотношение терапевтического эффекта и токсичности) лекарства. Липосомальные препараты, например, инкапсулированные доксорубин (Doxil[®], DaunoXome[®], Caelyx[®], Myocet[®]), амфотерицин В (Ambisome[®]), винкристин (Onco-TCS[®]), являются первыми нанолечествами, предназначенными для системного введения и одобренными к применению в клинике в конце 1990-х—начале 2000-х годов.

Особенно актуально применение липосомальных препаратов в онкологической клинике. В основе эффекта накопления (пассивного транспорта) частиц размера 50–150 нм в опухолях лежит дефектная архитектура образующейся *de novo* сосудистой системы — явление повышенной проницаемости капилляров и нарушенного лимфатического дренажа (EPR, enhanced permeability and retention; *Maeda et al., J. Contr. Rel.* 2000). На сегодня единственным технологичным методом достижения высокой емкости наноразмерных липосом в отношении водорастворимых препаратов является метод так называемой активной загрузки (remote loading) (*Barenolz et Haran, U.S. Patent* 1993; *Zucker et al., J. Contr. Rel.* 2009) — диффузии лекарств во внутренний объем липосом против градиентов концентраций солей аммония или ацетата кальция. Однако метод реализуем только для ограниченного числа субстанций, имеющих структуру амфифильных слабых кислот или оснований, например, доксорубин и других антрациклиновых антибиотиков.

В лаборатории химии липидов ИБХ РАН разрабатываются липосомальные препараты, получаемые методом включения лекарств в состав липидного бислоя липосом в виде липидных биodeградируемых производных (липофильных пролекарств). К преимуществам такого подхода, по сравнению с инкапсулированием во внутренний объем, относятся возможность создания наноразмерных липосом с приемлемой емкостью загрузки для широкого круга препаратов, уменьшение потерь препарата в кровотоке и при слиянии с клеткой, упрощение самой процедуры получения липосом, а также облегчение их внутриклеточной разгрузки за счет прямого трансмембранного переноса липофильных пролекарств. После интернализации клеткой липофильный остаток должен отщепляться внутриклеточными ферментами, высвобождая активный агент. Эффективность применения противоопухолевых средств в виде липофильных

пролекарств в липосомальных формах подтверждена в ряде экспериментов *in vivo* на моделях опухолей мышей. Так, липосомы, сформированные из природных фосфолипидов и сложноэфирных липофильных конъюгатов цитотоксического агента сарколизина (D,L-мелфалана) или цитостатика метотрексата, показали значительное улучшение терапевтических свойств по сравнению с исходными лекарствами при лечении лейкоза P-388 (Козлов и др., *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.* 1997), аденокарциномы молочных желез (Vodovozova et al, *Eur. J. Cancer* 2000), острого Т-лимфолейкоза (Водовозова и др., *Росс. Биотерапевт. Журн.* 2008). В то же время, исследований свойств данных липосом как супрамолекулярных систем доставки лекарств, то есть изучения их структуры, стабильности, устойчивости липофильных пролекарств при введении липосомальных препаратов в кровоток, ранее не проводилось.

По сравнению с другими наноразмерными носителями липосомы отличаются высокой биосовместимостью. Однако появляется все больше данных об иммуногенности некоторых липосомальных препаратов (Szebeni et al, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011). Реакции гиперчувствительности средней и тяжелой степени отмечены у части пациентов (до 45%) при внутривенном введении липосом Doxil[®], Ambisome[®], DaunoXome[®]. Такие реакции связаны с активацией липосомами системы комплемента. В связи с этим актуальными представляются исследования взаимодействий разрабатываемых липосомальных препаратов с компонентами крови.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы — исследование свойств липосом с липофильными пролекарствами мелфалана и метотрексата как новых систем доставки лекарств, то есть изучение физико-химических характеристик препаратов и исследование их взаимодействий с компонентами крови человека в условиях, близких к физиологическим.

В рамках работы предполагалось решить следующие экспериментальные задачи: 1) синтезировать диглицеридные сложноэфирные конъюгаты метотрексата и мелфалана (липофильные пролекарства); 2) определить характеристики липосомальных препаратов, получаемых на основе природных фосфолипидов и липофильных пролекарств: степень включения пролекарств в липосомы заданного состава, размеры и заряд липосом, стабильность дисперсий липосом и пролекарств в составе липосом; 3) исследовать гемосовместимость препаратов липосом; 4) исследовать взаимодействия липосом с отдельными компонентами плазмы крови человека.

Научная новизна

Впервые детально исследованы физико-химические свойства новых потенциальных систем доставки лекарств — липосом, нагруженных сложноэфирными конъюгатами противоопухолевых препаратов метотрексата и мелфалана с *rac*-1,2-диолеоилглицерином (MTX-DOG и Mlph-DOG). Ранее, при разработке структур молекул пролекарств, они были сконструированы таким образом, чтобы минимально нарушать упаковку липидного бислоя. В данной работе впервые показано, что пролекарства действительно эффективно встраиваются в липидный бислой, образуя в ходе экструзии вместе с матричными липидами — яичным фосфатидилхолином и фосфатидилинозитом из *S. cerevisiae* — моноламеллярные липосомы среднего диаметра 100 нм. Впервые исследована стабильность дисперсий наноразмерных лекарственных липосом. Показано, что коллоидные растворы можно хранить не менее 1 месяца при 4°C. Показана возможность длительного хранения дисперсий путем замораживания в жидком азоте — липосомы полностью регенерируются после размораживания и кратковременной ультразвуковой обработки. Установлено, что липофильные пролекарства в липосомальных формах стабильны в плазме крови человека не менее суток, то есть липосомы защищают сложноэфирные связи пролекарств от гидролиза эстеразами плазмы.

Впервые установлено в тестах *in vitro*, что препараты исследуемых липосом, в целом, являются гемосовместимыми системами доставки лекарств. Более того, показано, что наличие на поверхности липосом адресных тетрасахаридных лигандов селектинов SiaLe^{X/A} не влияет на гемосовместимость. Однако, в отличие от Mlph-липосом, препараты с MTX-DOG вызывали активацию системы комплемента, а также незначительное замедление коагуляции. Обнаружено, что модификация поверхности липосом при встраивании в бислой того или иного пролекарства определяет набор белков плазмы крови, вовлеченных во взаимодействие с липосомами, что, в свою очередь, отражается на функционировании протеолитических каскадов систем комплемента и коагуляции. Показано, что в случае MTX-липосом снижение нагрузки бислоя пролекарством полностью восстанавливает инертность липосом.

Практическая значимость

Полученные в данной работе результаты свидетельствуют о перспективности исследованных липосомальных препаратов как новых наноразмерных систем доставки лекарств для противоопухолевой терапии. Коллоидные растворы препаратов в солевом буфере достаточно стабильны; более того, их можно длительно хранить после низкотемпературного замораживания (подобно плазме крови доноров). Такие растворы содержат достаточные концентрации проле-

карств, чтобы оказывать терапевтический эффект при системном введении. Стабильность пролекарств в составе липосом к преждевременному гидролизу эстеразами плазмы должна способствовать увеличению времени циркуляции пролекарств в кровотоке и улучшению фармакокинетики препаратов.

Показано, что МТХ-DOG в липосомальной форме способен преодолевать устойчивость клеток лейкемии к метотрексату, обусловленную нарушением активного транспорта аналогов фолатов. Полученные данные представляют практический интерес, так как эффективность лечения метотрексатом ограничивается частым развитием резистентности, связанной, главным образом, именно с нарушением транспорта в клетку.

Использование природного фосфатидилинозита в качестве компонента, стабилизирующего липосомы в кровотоке (*Gabizon and Papahadjopoulos, PNAS* 1988), позволяет избежать побочных эффектов, связанных с иммуногенностью и токсичностью конъюгатов полиэтиленгликоля (ПЭГ) с фосфолипидами (*Moghimi et al, FASEB J.* 2006). Установлено, что липосомы с Mlph-DOG и МТХ-DOG гемосовместимы, то есть не оказывают отрицательного влияния на компоненты крови — эритроциты и тромбоциты, а также протеолитические каскады системы комплемента и коагуляции.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 06-04-49432-а), FEBS (программа Collaborative Experimental Scholarships for Central & Eastern Europe, 2009) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа У.М.Н.И.К.-2011).

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены автором в виде устных докладов на следующих конференциях: XIV Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Ломоносов-2007”, секция “Химия” (Москва, 2007), XXII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2010), 2^{ая} Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Москва, 2011). Результаты также были представлены на конференциях 6th International Workshop on Drug Delivery Systems for Nanomedicine (Liblice Castle, Czech Republic, 2008), 2nd European Summer School in Nanomedicine (Cascais–Lisboa, Portugal, 2009), Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения акад. Ю.А. Овчинникова (Москва–Пушино, 2009), 4th Liposome Advances Conference (London, UK,

2009), 3rd International NanoBio Conference (Zurich, Switzerland, 2010), XXIII Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2011), Liposomes in Jerusalem–2011 international conference (Jerusalem, Izrael, 2011), XXIV Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2012).

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 130 страницах и состоит из введения, обзора литературы, результатов и их обсуждения, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 243 наименования, и приложений. Диссертация содержит 23 рисунка и 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Синтез диглицеридных конъюгатов метотрексата и мелфалана

Цитостатик метотрексат (**МТХ**, антиметаболит фолиевой кислоты) широко используется в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит, где на сегодня он остается «лекарством номер один». МТХ конкурентно ингибирует дигидрофолатредуктазу и лишает клетку тетрагидрофолата, необходимого кофактора биосинтеза тимидилата. Эффективность лечения МТХ ограничивается не только его системной токсичностью, но и частым развитием клеточной устойчивости (например, при острой лимфобластной лейкемии — до 30% случаев). Мелфалан (**Mlph**) и его рацемат сарколизин — цитотоксические агенты алкилирующего типа, действующие независимо от стадии клеточного цикла и обладающие широким спектром противоопухолевой активности. Низкая стабильность при физиологических значениях рН и быстрое выведение из кровотока обуславливают необходимость введения высоких концентраций этих агентов, что сопровождается множеством побочных эффектов.

Диглицеридные конъюгаты метотрексата и мелфалана (**МТХ-DOG** и **Mlph-DOG**, Рис. 1) были синтезированы по разработанным ранее методикам (*Водовозова и др., Биоорганич. химия* 1996; *Хим.-фарм. журн.* 2007) в количествах, достаточных для изучения характеристик препаратов липосом и проведения серий экспериментов в биологических средах *in vitro* (более 100 мг каждого пролекарства). Структуры липофильных пролекарств отвечают ряду требований:

- диглицеридный мембранный якорь с двумя алифатическими ацильными цепями служит для надежного удерживания молекулы пролекарства в бислое;
- в случае объемистой молекулы метотрексата предусмотрен β-аланильный

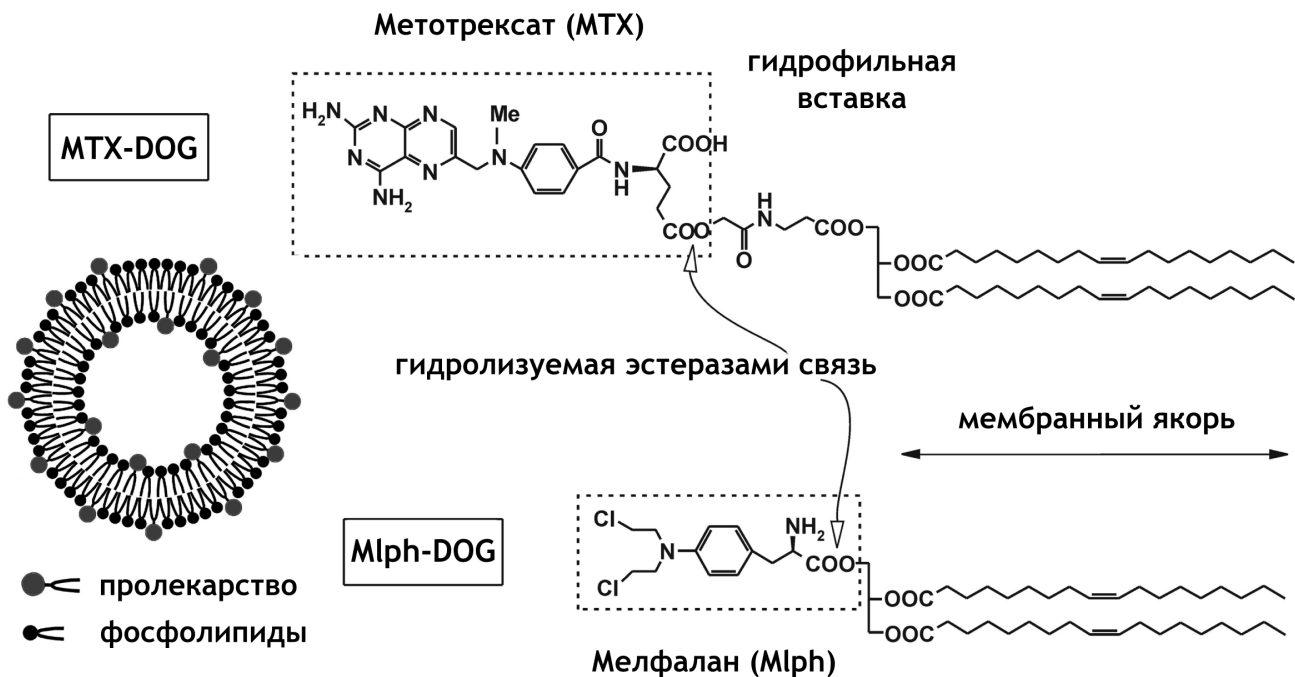


Рис. 1. Схематическое изображение конструкции липосом и структуры диглицеридных конъюгатов метотрексата и мелфалана (MTX-DOG и Mlph-DOG). Липосомы получали стандартным методом экструзии: растворы смесей липидов PC – PI – MTX-DOG/Mlph-DOG, 8 : 1 : 1 (мол.), в смеси хлороформ–метанол, 2 : 1, упаривали; липидные пленки высушивали 30 мин при 5 Па, затем гидратировали 2 ч при 20°C в физрастворе, pH 7.0–7.2 (для определения состава липосом — буфер HEPES, в остальных случаях — фосфатный); суспензию подвергали 5-ти циклам замораживания–оттаивания (жидкий азот/+40°C) и продавливали 10 раз последовательно через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размерами пор 200 и 100 нм на установке Mini-extruder (Avanti Polar Lipids, США).

линкер, который в бислое располагается в области полярных головок фосфолипидов, позволяя остаткам метотрексата 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 легко гидролизуется внутри клеток ввиду низкой субстратной специфичности эстераз.

Пролекарство Mlph-DOG получали исходя из мелфалана и *rac*-1,2-диолеоил-глицерина (1,2-Ole₂DOG) в три стадии: введение *Woc*-защиты аминофункции Mlph, реакция конденсации с использованием карбодиимидного метода и снятие защиты трифторуксусной кислотой. Благодаря оптимизации отдельных процедур в ходе выполнения реакции выход составил 70%, что существенно превысило ранее полученные результаты. Синтез MTX-DOG из MTX и 1,2-Ole₂DOG включал 6 стадий, ключевой из которых является алкилирование цезиевой соли MTX йодацетатом *n*-нитрофенола и выделение моноэфира по γ -

COOH МТХ. Продукт конденсации 1,2-Ole₂DOG с *Вос*-β-аланином (β-аланилдиглицерид) подвергали ацилированию активированным моноэфиром МТХ. Целевой продукт выделяли гель-фильтрацией на липофильном сефадексе с последующей хроматографией на силикагеле. Вещества охарактеризованы методами ¹H-ЯМР, УФ- и масс-спектрометрии.

Получение и характеристика липосом, нагруженных липофильными пролекарствами метотрексата и мелфалана

Липосомы (**L**; Рис. 1) готовили методом экструзии. Основу бислоя липосом (90 мол. %) составляют фосфатидилхолин (**PC**) из яичного желтка и фосфатидилинозит (**PI**) из пекарских дрожжей. Фосфатидилинозит (10 мол. % в бислое) способен стабилизировать липосомы в кровотоке за счет высокогидратируемых остатков инозита. Жирнокислотный состав природных липидов обеспечивает относительно низкую температуру фазового перехода бислоя, что способствует эффективному включению липидных производных. Липофильные пролекарства являются компонентами бислоя и даже при его повреждении «не вытекают» в водную фазу.

Включение (про)лекарства в состав бислоя значительно упрощает процедуру приготовления липосомальных препаратов с эффективной концентрацией терапевтического агента, исключая необходимость отделения от невключенного лекарства (например, с помощью гель-хроматографии или диализа) и сопутствующее разбавление дисперсии. При гидратировании липидных пленок задается концентрация пролекарств (~4 мМ) в конечных липосомальных дисперсиях, приемлемая для внутривенного введения с точки зрения доза/объем.

Исходная смесь липидов содержит 10 мол. % конъюгата Mlph-DOG или МТХ-DOG.

Состав липосом. Степень включения липофильных пролекарств в липосомы определяли с помощью гель-хроматографии на сефарозе: фракции анализировали на содержание фосфолипидов и пролекарств. На Рисунке 2 приведены хроматограммы препаратов после приготовления. Очевидно, что пики выходов фосфолипидов и пролекарств полностью совпали. Поскольку концентрации МТХ-DOG и Mlph-DOG в липосомальных дисперсиях практически соответствовали исходным количествам конъюгатов, взятым для приготовления липидных пленок (потери на мембранных фильтрах составляли не более 2–3 % в каждом случае), был сделан вывод о количественном включении конъюгатов в липосомы.

Размер липосом контролировали методами динамического лазерного светорассеяния (dynamic light scattering, **DLS**), анализа траекторий наночастиц (nanoparticle tracking analysis, **NTA**) и электронной микроскопии (**ЭМ**).

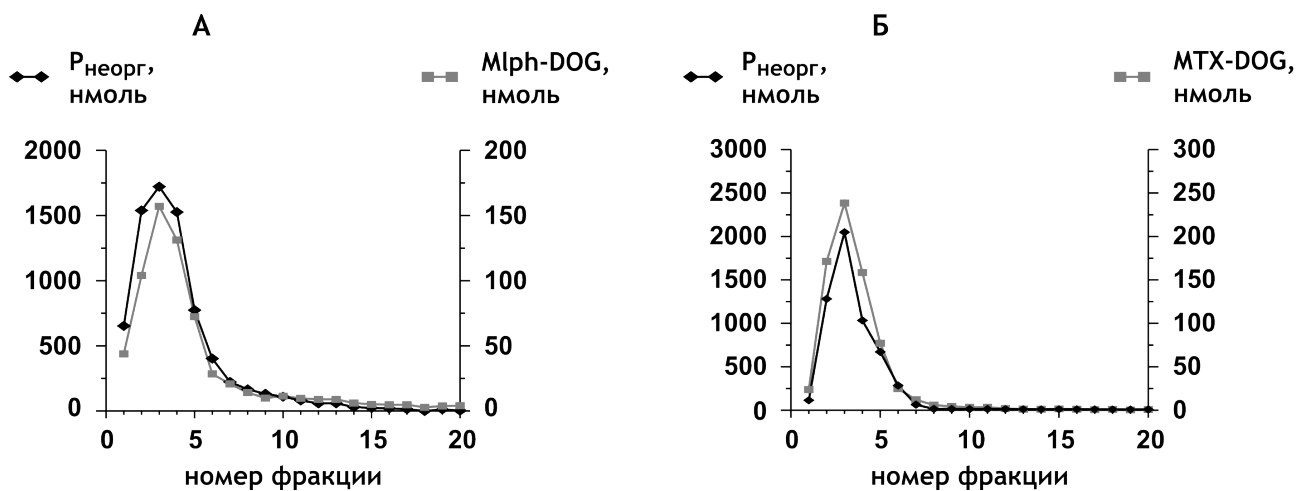


Рис. 2. Гель-хроматография на колонке с сефарозой CL-4B липосом после приготовления. После разрушения липосом 5-кратным объемом этанола во фракциях определяли фосфолипиды элементарным анализом на фосфор и конъюгаты (А) Mlph и (Б) MTX — спектрофотометрически (MTX-DOG: $\lambda_{\text{макс.}} = 302$ нм, $\varepsilon \sim 25000$; Mlph-DOG: $\lambda_{\text{макс.}} = 258$ нм, $\varepsilon \sim 19700$).

По данным измерений на приборе Brookhaven 90Plus (Brookhaven Instruments, США) средний размер свежеприготовленных липосом с пролекарствами составляет около 90 нм (Таблица 1). Дисперсии характеризуются узким распределением по размерам, о чем свидетельствуют значения ширины пиков на половине высоты. Низкие значения индекса полидисперсности (**PDI**) подтверждают, что коллоидные растворы липосом монодисперсны. Размеры Mlph-липосом в течение трех недель увеличиваются менее, чем на 5% (данные не приведены).

Данные прибора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания; Таблица 1) демонстрируют размеры липосом после транспортировки (в лабораторию проф. Я. Себени, Венгрия) для проведения дополнительных тестов на активацию системы комплемента. Большой диаметр MTX-L отражает несколько меньшую воспроизводимость размеров от серии к серии для этих липосом. Тем не менее, размеры MTX-липосом всегда лежат в желаемом диапазоне 50–150 нм и сохраняются при среднесрочном хранении: после недели транспортировки в неконтролируемых условиях (в основном, при +20°C) препараты представляют собой монодисперсные коллоидные растворы с узким распределением по размерам. Через месяц хранения и транспортировки средний размер MTX-L в данной партии составил 113.2 ± 5.0 нм ($\text{PDI} = 0.074 \pm 0.027$), то есть увеличился менее, чем на 14 % (данные установки Photocor, Photocor Instruments, США, снабженной автокоррелятором Brookhaven BI9000). Очевидно, свободные $\alpha\text{-COOH}$ группы остатка MTX, экспонированные на поверхности липосом, при длительном хранении конкурируют за связывание катионов металлов Me^{n+} с

Таблица 1. Размер липосом с пролекарствами метотрексата (MTX-L) и мелфалана (Mlph-L)

	DLS, Brookhaven 90Plus ^a			DLS, Malvern Zetasizer ^b			NTA, NanoSight
	D, нм	H _{1/2} , нм	PDI	D, нм	H _{1/2} , нм	PDI	D, нм
Mlph-L	90.4 ± 1.0	20.9 ± 2.9	0.056 ± 0.014	90.7 ± 0.4	17.5 ± 3.0	0.038 ± 0.013	89 ± 1
MTX-L	89.7 ± 1.3	15.9 ± 6.8	0.044 ± 0.025	99.4 ± 0.6	24.7 ± 3.7	0.063 ± 0.018	83 ± 2

D — средний диаметр, H_{1/2} — ширина пика на половине высоты, PDI — индекс полидисперсности; а — свежеприготовленные дисперсии липосом, б — дисперсии после недели хранения при +4 – +22°C.

присутствующим в буфере ЭДТА, что приводит к образованию «мостиков» между липосомами. При приготовлении MTX-липосом, для предотвращения агрегации липидных бислоев, в буфер вводили 1 мМ ЭДТА (по нашим данным, такой буфер не токсичен при внутривенном введении крысам).

В отличие от метода DLS, где математический аппарат позволяет рассчитать коэффициент диффузии для ансамбля частиц из временной автокорреляционной функции интенсивности рассеяния, в случае NTA коэффициент диффузии рассчитывается для индивидуальной частицы, поэтому NTA позволяет получить реальную картину распределения по размерам полидисперсных образцов (Filipe et al, Pharm. Res. 2010). Данные NTA (прибор Nanosight LM10HS, Великобритания; Таблица 1) надежно свидетельствуют о том, что исследуемые липосомы монодисперсны.

Электронная микроскопия позволяет не только судить о размерах липосом, но и дает наиболее информативную картину их ламеллярности. На Рисунке 3

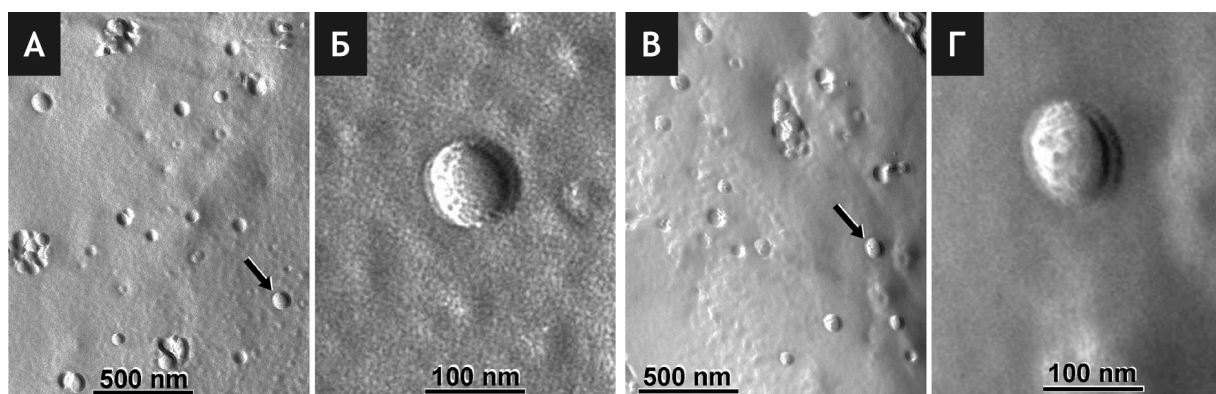


Рис. 3. Электронные микрофотографии (А, Б) MTX-L и (В, Г) Mlph-L, полученные методом замораживания со скалыванием (вакуумный пост JEE-4C, JEOL, Япония, и электронный микроскоп LIBRA120, Carl Zeiss SMT, Германия).

приведены микрофотографии поверхностей скола липосом, полученные через сутки после приготовления дисперсий. Образцы представляют собой моноламеллярные везикулы диаметра 50–100 нм. Дисперсии также изучали с помощью негативного контрастирования. Микрофотографии (Рис. 4А,Г) подтверждают данные замораживания–скалывания и свидетельствуют о том, что препараты МТХ-Л и Мlph-Л — дисперсии везикул размера до 100 нм.

Определение ζ -потенциала липосом проводили с помощью лазерной доплеровской анемометрии, измеряя скорость движения рассеивающих частиц дисперсии, помещенной в электрическое поле.

Таблица 2. ζ -потенциал липосом (Zetasizer Nano ZS)

Образец липосом	ζ -потенциал, мВ
РС/PI (без лекарства)	-42 ± 1
Мlph-Л	-34 ± 3
МТХ-Л	-53 ± 4
МТХ-Л-2.5*	-45 ± 2

*Состав аналогичен образцу МТХ-Л, загрузка МТХ-ДОГ 2.5 мол. %.

Как и следовало ожидать, все липосомы на основе смеси РС–PI характеризуются отрицательным потенциалом поверхности (Таблица 2). Наличие в бислое молекул Мlph-ДОГ с катионной полярной головкой частично компенсирует заряд. Напротив, чем больше МТХ-ДОГ присутствует в мембране, тем более отрицательный заряд несет поверхность липосом.

Длительное хранение липосом. По данным DLS дисперсии липосом в физиологическом растворе на фосфатном буфере (PBS), pH 7.0, могут сохраняться без существенной агрегации неделями. Однако сами лекарства в растворах столь долго не хранятся. Например, по данным ВЭЖХ мелфалан при инкубации в PBS, pH 7.0, 37°C, деградирует за 1 ч примерно на 20%, за 2 ч – на 40%, а за 18 ч – практически полностью. Для длительного хранения липосомальных препаратов можно использовать лиофилизацию дисперсий в присутствии криопротекторов, как правило, углеводов (трегалоза, сахароза и др.). Однако после регидратации происходит укрупнение липосом, что нежелательно с точки зрения способности осуществлять пассивный транспорт лекарств в опухоли, а также частичное вытекание лекарств из водного объема липосом. Кроме того, дополнительная стадия лиофилизации делает технологию производства значительно более дорогой. При включении липидных аналогов в мембрану липосом трудно представить, чтобы в результате процедуры замораживания–оттаивания пролекарства смогли перераспределиться из липидного бислоя в водную фазу. Мы исследовали возможность получения липосомальных препаратов длительного хранения путем низкотемпературного замораживания без криопротекторов. Дисперсии МТХ- и Мlph-липосом замораживали в жидком

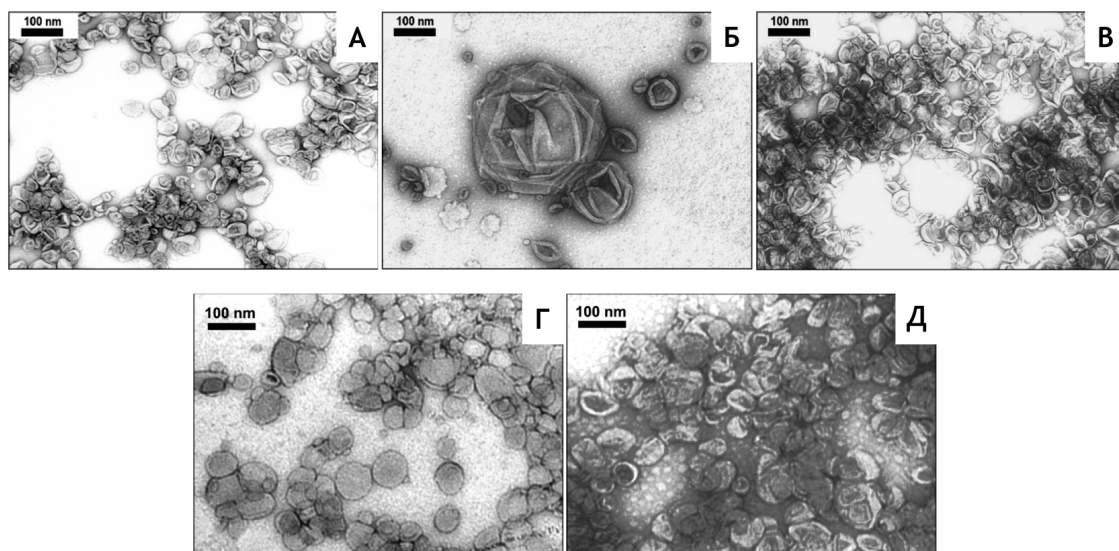


Рис. 4. Электронные микрофотографии липосом (метод негативного контрастирования $UO_2(CH_3COO)_2$, установка JEM 100CX11, JEOL). Свеже-приготовленные Mlph-L (А) замораживали в жидком азоте и хранили при $-70^\circ C$; агрегаты липосом после размораживания при $40^\circ C$ (Б); восстанавливание липосом после кратковременной обработки на ультразвуковой бане (В). МТХ-L после приготовления (Г) и после размораживания (без ультразвуковой обработки) (Д).

азоте и хранили при $-70^\circ C$. После размораживания ($+40^\circ C$) образовывались мутные дисперсии, что указывало на агрегацию везикул. Кратковременные (4×5 мин) обработки на ультразвуковом дезинтеграторе банного типа позволили получить слабо опалесцирующие дисперсии.

Результаты изучения размеров и степени агрегации липосом с помощью ЭМ методом негативного контрастирования представлены на Рисунке 4. Липосомы, содержащие Mlph-DOG, при размораживании частично образуют крупные плотные конгломераты (Рис. 4Б), которые диспергируются до исходных частиц ультразвуковой обработкой (Рис. 4В). Напротив, МТХ-липосомы, при размораживании не образуют плотных агрегатов (Рис. 4Д). Это согласуется с данными DLS (не приведены), из которых следует, что МТХ-L уже после первого цикла УЗ-обработки восстанавливают исходные размеры, в отличие от Mlph-L. По-видимому, это объясняется экспонированием отрицательного заряда α -карбоксила остатка МТХ на поверхности липосом.

Состав липосом после размораживания и ультразвуковой обработки определяли с помощью гель-хроматографии на сефарозе с последующим анализом фракций, как это описано для липосом сразу после приготовления. Результаты (не показаны), аналогичные приведенным на Рисунке 2, свидетельствуют о том, что выделения пролекарств из липидного бислоя липосом в отдельные агрегаты не происходит.

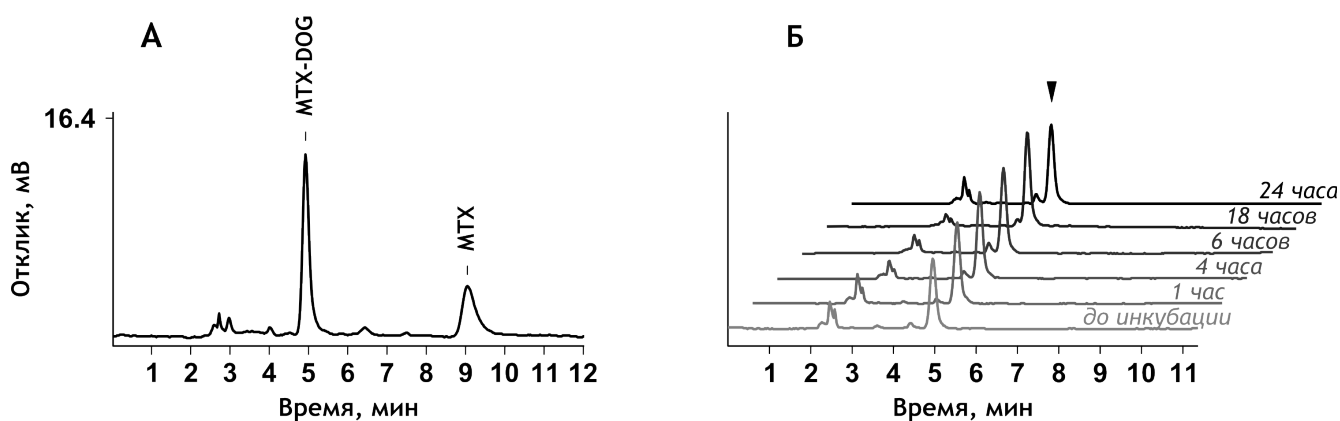


Рис. 5. *А.* Пример хроматограммы смеси стандартных растворов 2.5 мкг/мл MTX и 5 мкг/мл MTX-DOG в системе хлороформ–метанол, 75 : 25, колонка Luna Silica, 5 мкм, 4.6 × 250 мм (Phenomenex, USA). *Б.* Результаты анализа хлороформ–метанольных экстрактов из плазмы крови человека после инкубации с MTX-липосомами. Стрелка указывает на пик MTX-DOG.

Стабильность липофильных пролекарств в составе липосом в плазме крови человека *in vitro*. Для изучения устойчивости пролекарств по отношению к эстеразам плазмы крови человека нами разработаны методики определения MTX (Mlph) в смеси с его липидным производным с помощью ВЭЖХ. Основная трудность такого анализа связана с подбором системы для разделения веществ с принципиально отличающимися полярными свойствами. Широко применяемая хроматография на обращенной фазе в градиентной системе растворителей (вода–ацетонитрил, изопропанол и т.п.) не дала положительных результатов. В случае MTX/MTX-DOG была использована колонка с прямой фазой (силикагелем), а в качестве элюента — смесь органических растворителей в изократическом режиме.

Липосомы инкубировали с образцами свежей плазмы, полученной из смешанных пулов крови доноров (случайная выборка). По данным двух независимых экспериментов (в двух повторах), MTX-DOG в составе липосом в 90%-ной плазме крови человека не деградирует вплоть до 24 ч инкубации при 37°C (Рис. 5), о чем судили по отсутствию пика MTX и неизменной интенсивности пика MTX-DOG.

Разработка аналогичной методики ВЭЖХ-анализа смесей мелфалана с производным Mlph-DOG оказалась затруднена нестабильностью мелфалана как такового при инкубации в нейтральной водной среде при 37°C. Кроме того, хроматография на силикагеле осложнялась ионными эффектами свободной аминофункции Mlph-DOG (исходный мелфалан образует внутреннюю соль). Поэтому одновременное определение мелфалана и Mlph-DOG проводили с по-

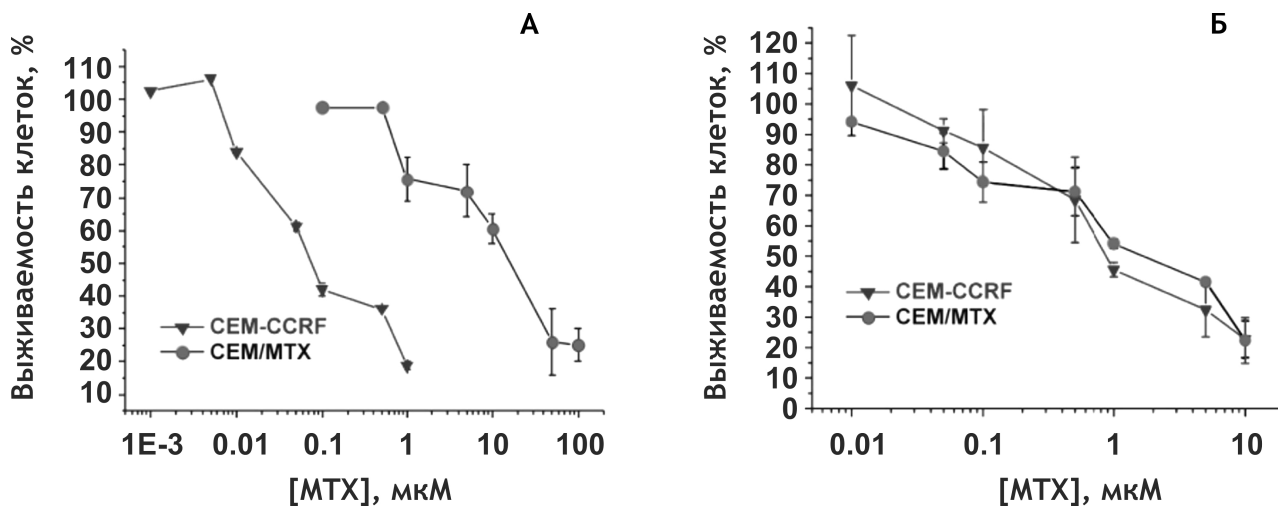


Рис. 6. Цитотоксичность MTX (А) и MTX-L (Б) в культурах клеток Т-лимфобластоидной лейкемии человека (CEM-CCRF) и MTX-резистентной сублинии (CEM/MTX). Приведены средние значения \pm SE двух независимых экспериментов (каждый проведен в двух повторах). Использована программа Origin 6.0 (MicroCal Software Inc., США).

мощью ВЭЖХ на обращенной фазе (С18) с использованием в системе ион-парного реагента¹. При сравнении хроматограмм после инкубаций липосом в PBS и плазме крови человека при 37°C вплоть до 24 ч разницы между ними обнаружено не было: оба пика исходного Mlph-DOG постепенно и пропорционально уменьшались (деградация остатка Mlph), причем появления новых пиков в данных условиях ВЭЖХ не наблюдалось (данные не приведены). Таким образом, можно сделать вывод, что эстеразы плазмы крови, как и в случае MTX-липосом, не расщепляют Mlph-DOG в составе липосом с высвобождением мелфалана (или продуктов его гидролиза).

Цитотоксическая активность липосом с MTX-DOG в культуре метотрексат-резистентных клеток. Эффективность лечения метотрексатом ограничивается частым развитием резистентности, связанной, главным образом, с нарушением активного транспорта в клетку. В связи с этим исследована способность конъюгата метотрексата в липосомальной форме преодолевать устойчивость опухолевых клеток к MTX, обусловленную нарушением импорта лекарства в клетку из-за пониженной функции белка-транспортера восстановленных фолатов (RFC). Было проведено сравнительное определение цитотоксической активности липосом с MTX-DOG *in vitro* в культурах клеток лейкемии человека с различной чувствительностью к MTX: Т-лимфобластоидной линии CEM-CCRF и сублинии CEM/MTX, устойчивой к MTX из-за дефицита RFC. Цитотоксическую активность (концентрацию, вызывающую ин-

1) Линейный градиент В в А 30→100% за 11 мин; А: 20 мМ гексилсульфоната натрия в H₂O, 1% монохлоруксусной кислоты, В: AcCN – AcOH, 9 : 1.

Таблица 3. Результаты тестов на гемосовместимость липосом с пролекарствами

Образец липосом	Кол-во и распределение по размерам эритроцитов и тромбоцитов	АЧТВ/ПТ	Гемолиз	С3а ИФА	С5b-9 ИФА	СН50-тест
Mlph-L	—	—	—	—	—	—
Mlph-L-SiaLe^{A*}	—	—	—	—	н.д.	н.д.
Mlph-L-SiaLe^{X*}	—	—	—	—	—	—
Mlph-L-SiaLe^API^{**}	—	—	—	—	н.д.	н.д.
MTX-L	—	++/+	—	++	—	++
MTX-L-SiaLe^{A*}	—	++/+	—	++	—	++
MTX-L-10[*]	—	++/+	—	++	н.д.	н.д.
MTX-L-2.5[*]	—	+/+	—	+	—	—
Контрольный раствор MTX	—	—	—	—	н.д.	н.д.

Примечания: —, слабый эффект или его отсутствие, +, эффект средней интенсивности, ++, сильное влияние на показатели крови, н.д., нет данных; *, адресные липосомы, несущие 2 мол. % липофильного конъюгата SiaLe^{X/A}; **, образец, идентичный Mlph-L-SiaLe^A, но без PI; СН50 — тест на остаточную гемолитическую активность.

гибирование пролиферации клеток на 50%, IC_{50}) MTX (Рис. 6А) и липосом с MTX-DOG (Рис. 6Б) в культурах клеток СЕМ/MTX и родительской линии MTX-чувствительных клеток лейкемии СЕМ-CCRF определяли стандартным для MTX образом — по включению трипанового синего. Для MTX IC_{50} составляла 16.4 ± 4.9 и 0.075 ± 0.005 мкМ в культурах СЕМ/MTX и СЕМ-CCRF, соответственно; для MTX-DOG — 1.68 ± 0.05 и 0.88 ± 0.07 мкМ. Следовательно, резистентность (отношение IC_{50} СЕМ/MTX к IC_{50} СЕМ-CCRF) уменьшилась от значения 218 до 1.9 (в 114 раз) при переходе от MTX к липосомальной форме MTX-DOG.

Исследование взаимодействий липосом с компонентами крови

Тесты на гемосовместимость. В кровотоке липосомы контактируют как с белками плазмы, так и с клетками крови, и могут вызвать нарушения в их функционировании. С помощью панели тестов *in vitro* мы исследовали гемосовместимость липосом с пролекарствами Mlph-DOG и MTX-DOG согласно требованиям стандартов Международной организации по стандартизации ISO 10993-4. Также были проанализированы образцы адресных липосом, несущих тетрасахаридные лиганды селектинов¹ сиалил Льюис X и A (SiaLe^{X/A}).

1) Селектины — Ca²⁺-зависимые трансмембранные гликопротеины, экспрессирующиеся на поверхности активированных лейкоцитов, тромбоцитов и эндотелиальных клеток; они являются перспективной мишенью для селективной доставки терапевтических агентов в сосуды опухолевой ткани (Barthel et al, *Expert. Opin. Ther. Targets*, 2007).

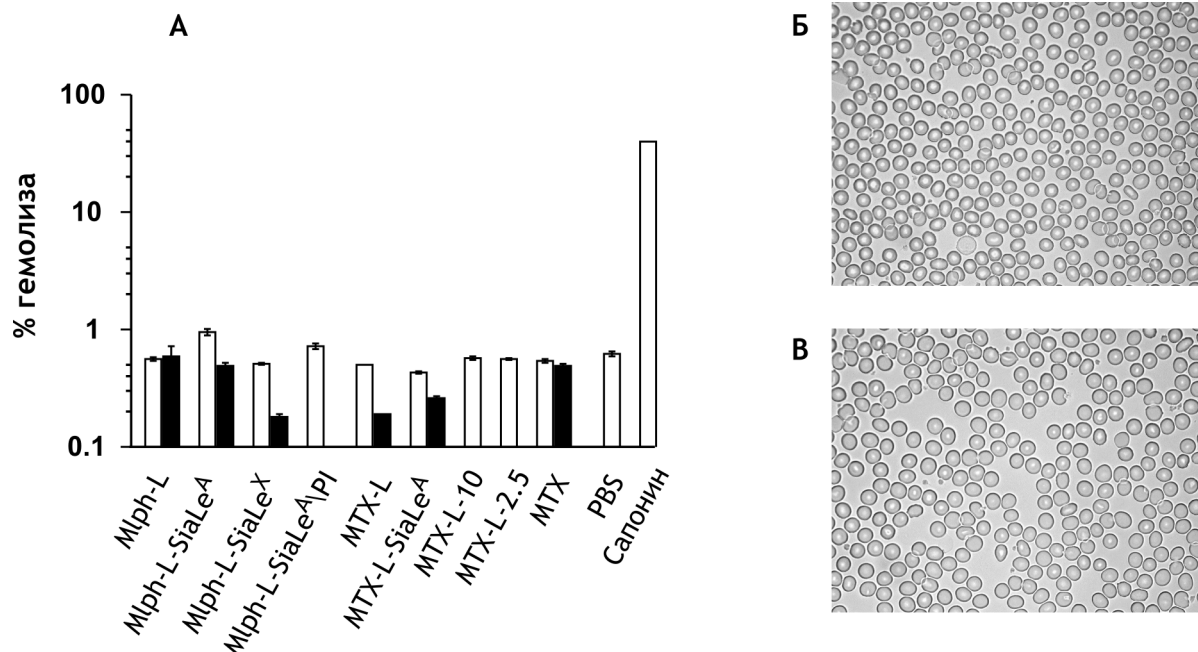


Рис. 7. А. Степень гемолиза эритроцитов в присутствии липосом определяли с использованием реагента Драбкина; белые столбцы соответствуют конечной концентрации липосом в крови 0.4 мМ по пролекарству, черные — 0.04 мМ, за исключением образцов MTX-L-10 и MTX-L-2.5 (0.1 мМ). Отрицательный контроль — PBS, положительный — сапонин, 2 мг/мл (в комплексе с холестерином вызывает образование мембранных пор и, как следствие, гемолиз); приведены средние значения двух измерений \pm SE. Фотографии мазков крови после инкубации с Mph-L (0.4 мМ по пролекарству; **Б**) или PBS (**В**).

Исследовано влияние липосом на целостность, морфологию, распределение по размерам и количество эритроцитов и тромбоцитов, активацию системы комплемента и каскада коагуляции. Результаты обобщены в Таблице 3.

Согласно полученным данным, ни один из препаратов липосом не приводил к изменению морфологии эритроцитов (например, см. Рис. 7Б,В). Значения концентрации гемоглобина в плазме во всех испытанных образцах находились на фоновом уровне, то есть липосомы не вызывали гемолиза эритроцитов (Рис. 7). Инкубация с липосомальными препаратами не влияла на численность эритроцитов и тромбоцитов, равно как и на их распределение по размерам (Coulter Multisizer IIS, Coulter Electronics; данные не приведены).

Таким образом, можно констатировать инертность Mph- и MTX-липосом по отношению к основным клеткам крови. Это наблюдение особенно ценно по отношению к тромбоцитам, так как, будучи ответственными за поддержание гемостаза, они являются более чувствительными к чужеродным поверхностям, вызывающим их активацию и агрегацию. Помимо этого, инертность SiaLe^{X/A}-липосом косвенно свидетельствует о том, что они направлены именно на клетки, участвующие в патологических процессах (селектины экспрессируются

только на стимулированных клетках).

Влияние липосом на свертывание крови. Два взаимодополняющих клинических теста были использованы для оценки влияния липосом на функционирование системы коагуляции: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбиновый тест (ПТ). В первом случае оценивали эффективность внутреннего (контактного) пути активации коагуляции по времени образования фибринового сгустка в рекальцифицированной плазме после добавления контактного активатора (суспензия каолина) и фосфолипидов (фосфатидилэтаноламин). В контрольном эксперименте без добавления каолина к плазме образования сгустка не наблюдалось, то есть поверхность липосом не инициирует внутренний путь коагуляции. Протромбиновый тест служит мерой активности внешнего пути активации свертывания крови. Измеряют время образования сгустка после добавления к рекальцифицированной плазме крови тканевого фактора.

В Таблице 4 представлены результаты тестов АЧТВ и ПТ, выполненных с образцами плазмы, полученными после инкубации липосом с кровью и отделения клеточных компонентов. Приведенные величины соответствуют свертывающей способности того или иного образца относительно стандартной плазмы крови человека (100%). Чем быстрее образовывался сгусток, тем больше свертывающая способность. В целом, M ϕ h-липосомы влияли на скорость тромбообразования в пределах нормы, в то время как липосомы с МТХ-DOG вызывали значительное увеличение времени коагуляции.

Образцы МТХ-L-SiaLe^A и МТХ-L вызывали увеличение времени тромбообразования в тесте на АЧТВ на ~55 и 15% при концентрациях МТХ-DOG в крови 0.4 мМ и 0.04 мМ соответственно. Эти образцы также вызывали снижение способности к тромбообразованию в плазме, хотя и менее значительное, в тесте ПТ: на 33 и 7%, соответственно.

Чтобы лучше понять природу наблюдаемого явления, мы уменьшили концентрацию пролекарства, вводимого в контакт с кровью, в 4 раза (0.1 мМ после разбавления кровью) за счет (а) использования менее концентрированной дисперсии липосом, как и прежде с 10 мол. % МТХ-DOG (образец МТХ-L-10), и (б) уменьшения нагрузки бислоя до 2.5 мол. % (образец МТХ-L-2.5). Для такого промежуточного значения концентрации пролекарства (0.1 мМ после разбавления кровью) значения времени тромбообразования в обоих тестах (АЧТВ и ПТ) составили среднее между двумя разведениями образцов МТХ-L и МТХ-L-SiaLe^A (0.4 и 0.04 мМ) первого эксперимента. Интересно, что во второй серии образцов менее концентрированная по липидам дисперсия (то есть создающая меньшую по площади поверхность) более значительно ингибировала коагуля-

Таблица 4. Влияние липосом на время коагуляции в стандартных клинических тестах, выполненных после инкубации липосом кровью человека *in vitro**

Образец липосом	АЧТВ		ПТ	
	внешний путь		внутренний путь	
	Конечная концентрация пролекарства в крови			
	0.4 mM	0.04 mM	0.4 mM	0.04 mM
Мlph-L	100.0	96.7	86.2	81.3
Мlph-L-SiaLe^A	100.0	100.0	89.8	95.4
Мlph-L-SiaLe^X	100.0	100.0	89.8	100.9
Мlph-L-SiaLe^API	83.7	<i>н.д.</i>	93.5	<i>н.д.</i>
MTX-L	45.7	86.7	67.1	93.5
MTX-L-SiaLe^A	42.6	83.1	67.1	93.5
MTX-L-10	52.5	<i>н.д.</i>	75.4	<i>н.д.</i>
MTX-L-2.5	68.0	<i>н.д.</i>	79.9	<i>н.д.</i>
Контрольный раствор MTX	100.0	100.0	101.6	98.4
“_” контроль	100.0	100.0	99.1	97.2

*Приведена относительная способность образца к коагуляции по сравнению с таковой стандартного образца плазмы человека, %, определенная на коагулометре Dade Behring. *н.д.*, нет данных.

цию, чем образец с большей общей концентрацией липидов, но меньшей плотностью остатков MTX на поверхности. Ингибирование обоих путей коагуляции может быть следствием неспецифической адсорбции белков-участников каскада на поверхности материала, контактирующего с плазмой, в том числе ключевых факторов гуморальных реакций крови фибриногена, факторов IX и X, протромбина и антитромбина III (*Yancheva et al, Macromol. Biosci.*, 2007).

Активация системы комплемента. Влияние липосом на систему комплемента (СК) исследовали на разных этапах активации с помощью трех методов: определения количества образуемого фрагмента C3a в крови и комплекса SC5b-9 в сыворотке с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и определения остаточной гемолитической активности системы комплемента после инкубации сыворотки крови с липосомами. Активации СК по любому из трех основных путей — классическому (при участии специфических антител, а также без них), лектиновому (посредством лектина, связывающего маннозу) или альтернативному — приводит к образованию C3-конвертаз C4b2a и C3bBb, которые гидролизуют фактор C3 с высвобождением фрагмента C3a. Количество образуемого C3a позволяет судить о возможном анафилактическом эффекте препарата. Терминальной стадией активации СК является образование мембраноатакующего комплекса (МАК) C5b-9. В отсутствие липидной мембраны C5b-9 образует комплекс SC5b-9 с водорастворимым S-белком (витронектином); об-

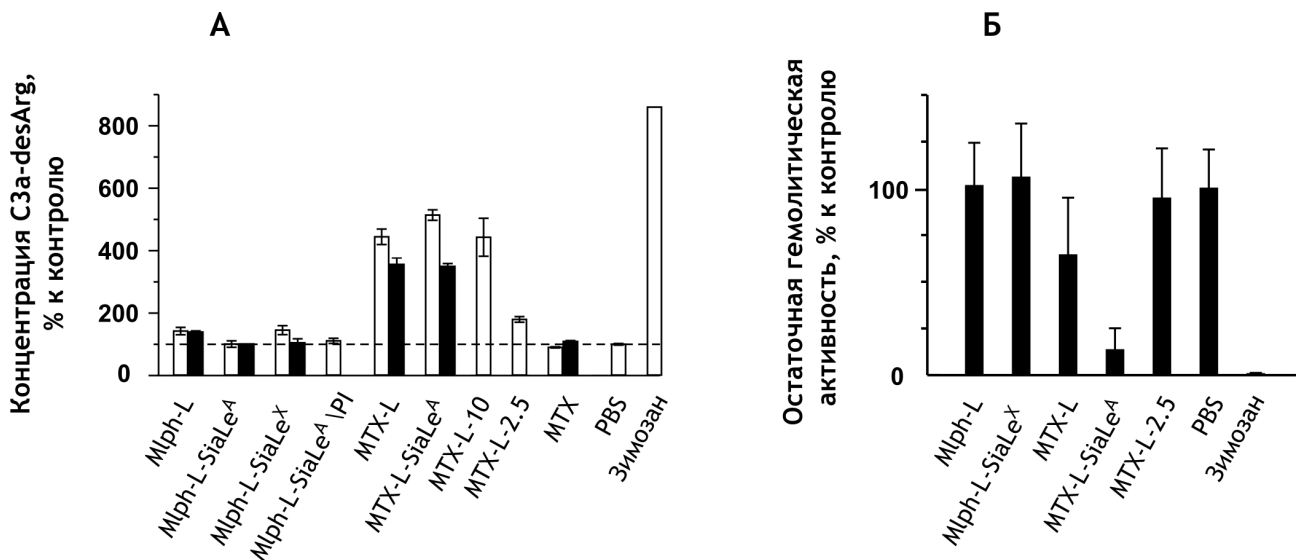


Рис. 8. Результаты оценки степени активации СК в присутствии липосом *in vitro*. **А.** Количество стабильного метаболита C3a — C3a-desArg, — определяемое методом ИФА; обозначения см. в подписи к Рисунку 7А. **Б.** Остаточная гемолитическая активность сыворотки крови после инкубации с липосомами (конечная концентрация по пролекарству 1 мМ). Отрицательный контроль — плазма крови после инкубации с PBS, положительный — зимозан (суспензия полисахаридов, выделенных из клеточной стенки *S. cerevisiae*, 2 мг/мл); приведены средние значения минимум двух измерений $\pm SE$.

нарушение SC5b-9 в ИФА свидетельствует об активации всего каскада СК. Наконец, остаточная гемолитическая активность является исчерпывающим и надежным методом определения активации СК, свободным от ограничений и артефактов, возможных в случае использования ИФА для определения одного из факторов каскада.

Судя по количеству высвобождаемого C3a (Рис. 8А), Mlph-L ускоряли активацию СК менее, чем в 1.5 раза по сравнению с контролем. Вероятность того, что подобная активация системы комплемента *in vivo* приведет к клинически выявляемым последствиям, мала. Во всяком случае, определение количества SC5b-9 с помощью ИФА в образцах сыворотки крови после 10 мин инкубации с липосомами Doxil[®] *in vitro* позволяло достоверно ($p < 0.05$) прогнозировать активацию СК *in vivo* только в том случае, если *in vitro* детектировали значения, превышающие нормальный уровень SC5b-9 в 2–4 раза (Szebeni *et al*, *in Liposome Technology*, 2007).

Напротив, MTX-L вызывали высвобождение значительных количеств C3a (Рис. 8А) и заметное истощение системы комплемента в целом (Рис. 8Б). Уменьшение концентрации липосом в 4 раза приводило к снижению активации системы комплемента в 1.2–1.5 раз. Ещё больший эффект достигался за счет уменьшения количества пролекарства в бислое липосом с 10 до 2.5 мол. %. Природа высокой степени активации СК образцом MTX-L-SiaLe^x в тесте на

остаточную гемолитическую активность (Рис. 8Б) неясна. Как правило, результаты этого теста хорошо коррелируют с результатами определения продуктов активации СК. В нашем случае наличие SiaLe^{X/A} лиганда как такового не влияло на гемореактивность липосом, выявляемую методом ИФА С3а, а также в тесте на остаточную гемолитическую активность в случае образцов Mlph-L-SiaLe^{X/A} и МТХ-L-2.5. Возможно, наблюдаемая активация СК образцом МТХ-L-SiaLe^X связана с особенностями взаимного расположения остатков МТХ и тетрасахарида SiaLe^X на поверхности липосом, что в свою очередь влияет на связывание тех или иных компонентов терминального пути СК и/или регуляторных факторов.

Наличие или отсутствие PI, фактора, стабилизирующего поверхность липосом (образцы Mlph-L-SiaLe^A и Mlph-L-SiaLe^A\PI), не влияло на реактивность липосом.

При измерении количества SC5b-9 комплекса, образуемого в 75% сыворотке в присутствии липосомальных дисперсий, 1-мМ по пролекарствам, значительного увеличения концентрации этого маркера по сравнению с контролем не наблюдалось (данные не приведены). Это кажущееся противоречие между результатами оценки активации системы комплемента по выработке С3а и SC5b-9, по-видимому, объясняется следующим образом: поверхность МТХ-липосом действительно активирует СК, однако образующийся МАК предпочитает встроиться в мембрану липосом, и образования комплекса SC5b-9 в жидкой фазе не происходит.

Отметим, что образцы раствора МТХ в равной по лекарственному началу концентрации не вызывали нежелательных эффектов ни в тестах на активацию коагуляции, ни в тестах на активацию СК (Таблица 4 и Рис. 8). В случае МТХ-L каждая молекула пролекарства в бислое экспонирует на поверхности пару ароматических NH₂-функций, а также свободный α-карбоксил. Экспонированные же NH₂ (и OH) группы, расположенные особым образом относительно друг друга, могут вызывать активацию СК, предположительно, посредством нуклеофильной атаки на внутреннюю тиоэфирную связь фрагмента С3b, что приводит к ускорению спонтанного гидролиза С3 и активации альтернативного пути.

Прямой и очевидный способ разрешить проблему реактивности МТХ-липосом — уменьшить концентрацию пролекарства в бислое. С точки зрения потенциальной эффективности лечения это возможно, так как наименьшая концентрация, исследованная в данной работе и вызвавшая лишь незначительные эффекты со стороны биологических каскадов, — 40 мкМ МТХ-DOG в крови —

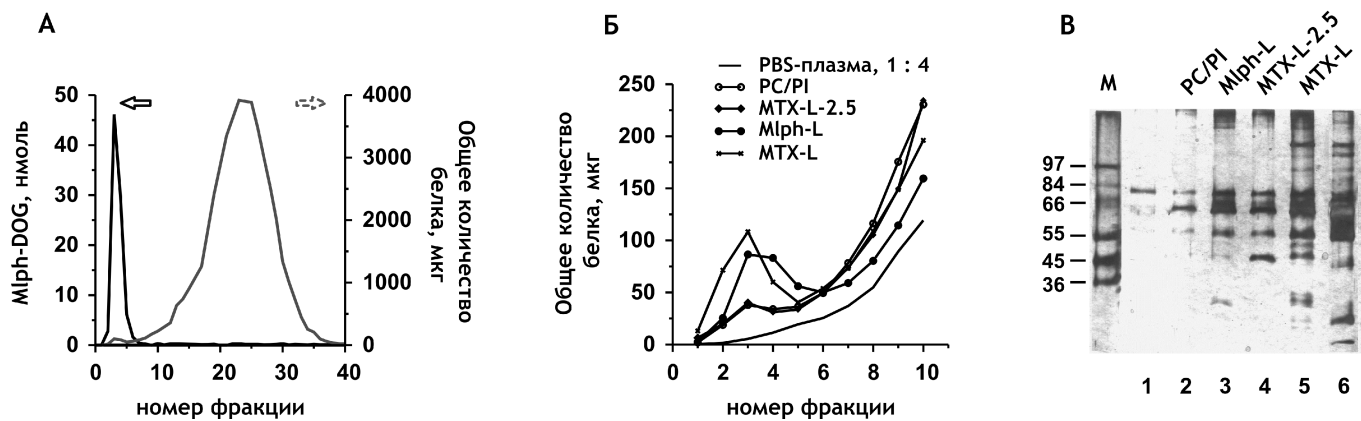


Рис. 9. **А.** Профили элюции липосом и белков при выделении гель-хроматографией колонке с сефарозой CL-4В липосом-белковых комплексов после инкубации липосом (на примере Mlph-L) с 80% плазмой в течение 15 мин при 37°C. Идентификация пролекарства — УФ-спектр, белка — модифицированный метод Лоури. **Б.** Сравнение профилей элюции белков после инкубации препаратов липосом с плазмой и контрольного образца плазмы после инкубации с PBS. **В.** Результат разделения белков, ассоциированных с липосомами, с помощью электрофореза по Лэммли. Наносимые образцы содержали равное количество липидов (дорожки 2–5). Дорожка 1 – образец плазмы после инкубации с PBS, 6 – плазма в разведении 1/500.

соответствует терапии лейкемии низкими дозами МТХ¹. Дозировку липосомальной формы для внутривенного введения ещё предстоит оптимизировать, однако ожидается, что она не превысит используемые количества интактного лекарства.

Идентификация белков плазмы, ассоциированных с лекарственными липосомами. Комплексы липосом с ассоциированными белками выделяли после 15 мин инкубации в 80%-ой плазме с помощью гель-хроматографии на сефарозе, одновременно контролируя во фракциях содержание белка и пролекарства. Фракции с наибольшим содержанием пролекарства объединяли, делипидизировали и анализировали с помощью электрофореза в ПААГ по Лэммли (Рис. 9А). Как МТХ-, так и Mlph-липосомы связывали значительное количество белка (~80 г белка/моль липидов; Рис. 9Б), однако даже неспецифически окрашенный гель демонстрирует различия в наборе белков плазмы, вовлеченных во взаимодействие с липосомами разного состава (Рис. 9В). Для всех липосомальных препаратов доминирует полоса, соответствующая молекулярной массе 66 кДа и, по-видимому, представляющая собой сывороточный альбумин (он составляет ~60 % суммарного белка плазмы), для которого характерно активное связывание с поверхностью липосом. Полоса с массой около 55 кДа, скорее всего, соответствует мономеру фибриногена — также одного из основных по содержанию

1) Из расчета средней дозы в 20–60 мг/м² для человека среднего роста 1.60–1.70 м и веса 60–70 кг с 5 л крови.

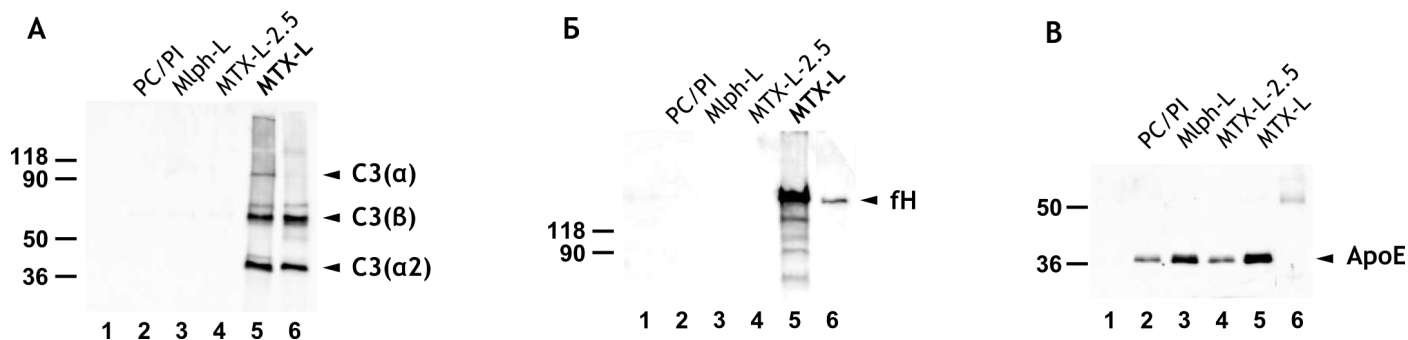


Рис. 10. Идентификация белков, ассоциированных с липосомами, методом иммуноблоттинга с использованием антител к белкам плазмы человека: компонентам системы комплемента C3 (А) и фактору H, fH (Б), а также апо-липопротеину E, ApoE (В).

белков плазмы. Другие выраженные полосы предварительно были отнесены к α -, α_2 - и β -цепям фактора комплемента C3 (~130, 45 и 73 кДа, соответственно), тяжёлой цепи IgG (~50 кДа), IgM (75 кДа) и C4b-связывающему белку (~75 кДа).

С помощью метода иммуноблоттинга было обнаружено, что Mph-L и MTX-L в равной мере связывали один из регуляторных белков СК — C4b-связывающий белок (не показано). Однако только в составе комплексов белков с MTX-L были обнаружены значительные количества фрагментов компонента C3 и фактора H (fH) (Рис. 10А и Б) — регуляторного компонента альтернативного пути СК (ингибирует амплификацию сигнала за счет петли усиления альтернативного пути активации). По-видимому, активация СК приводит к гидролизу α -субъединицы компонента C3 с высвобождением анафилотоксина C3a (который мы детектировали с помощью ИФА в плазме в присутствии MTX-липосом, см. выше, Рис. 8А), и фрагмента C3b (субъединицы α' + β). Фрагмент C3b связывается с поверхностью MTX-L и в присутствии fH, также сорбированном на поверхности, расщепляется под действием фактора I — еще одного белка-регулятора каскада СК. Образующийся фрагмент iC3b остается связанным с поверхностью. Важно отметить, что ни фрагменты C3, ни fH не были обнаружены среди белков плазмы, связанных с липосомами с пониженным содержанием MTX-DOG (образец MTX-L-2.5). Это может объясняться принципиально иной архитектурой поверхности MTX-L-2.5 липосом, свободной от напряжений и деформаций в строении бислоя, предположительно свойственных MTX-DOG-липосомам с 10 мол. % пролекарства.

В условиях эксперимента не удалось обнаружить связывание с липосомами таких активных неиммунных опсонизирующих агентов, как фибронектин (Fne) и аполипопротеин AI (ApoAI; данные не приведены). Таким образом, можно констатировать по крайней мере, что концентрирования Fne или ApoAI на по-

верхности липосом по сравнению с раствором в плазме не происходит. Поэтому вряд ли эти белки активно участвуют в выводе липосом из кровотока.

Аполипопротеин Е (АроЕ; 34 кДа) является основным компонентом хиломикрон и липопротеинов промежуточной плотности. Благодаря высокому сродству к семейству рецепторов липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), АроЕ играет ключевую роль в транспорте и метаболизме богатых триглицеридами липопротеиновых фракций. Наблюдаемое связывание АроЕ со всеми образцами липосом (Рис. 10В, дорожки 2–5) может свидетельствовать о том, что в кровотоке липосомы будут направляться к тканям и органам, экспрессирующим рецепторы ЛПНП, в том числе и в опухоли.

Таким образом, на примере идентифицированных белков показано дифференциальное связывание белков плазмы липосомами разного состава. Обнаруженные различия в связывании факторов СК позволяют сделать предположения о механизме наблюдаемой в тестах *in vitro* активации системы комплемента МТХ-липосомами.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы физико-химические свойства новых систем доставки лекарств — липосом, нагруженных липофильными пролекарствами противоопухолевых препаратов метотрексата и мелфалана (МТХ-DOG и Мlph-DOG). Показано, что пролекарства — сложноэфирные конъюгаты с *rac*-1,2-диолеилглицерином — эффективно встраиваются в липидный бислой моноламеллярных липосом среднего диаметра 100 нм, сформированных на основе природных фосфолипидов (фосфатидилхолина и фосфатидилинозита) методом экструзии.
2. Установлено, что дисперсии липосом, содержащие релевантные для системного введения в организм концентрации пролекарств (при нагрузке липосом 10 мол. %), стабильны не менее 1 месяца при 4°C. Показана возможность длительного хранения дисперсий после замораживания.
3. Установлено, что липофильные пролекарства в составе липосом стабильны в плазме крови человека не менее суток, следовательно, высвобождения исходных лекарств не происходит.
4. Показано, что МТХ-DOG в липосомальной форме способен преодолевать лекарственную устойчивость опухолевых клеток к метотрексату.
5. В серии тестов *in vitro* установлена гемосовместимость липосом с Мlph-DOG, то есть отсутствие влияния на морфологию эритроцитов и тромбоцитов, а также функционирование систем комплемента и коагуляции. Наличие на поверхности липосом адресных тетрасахаридных лигандов селектинов SiaLe^{X/A} не

влияет на гемосовместимость.

6. Обнаружено, что липосомы с МТХ-DOG, в целом, гемосовместимые, вызывают активацию системы комплемента и незначительное замедление коагуляции. Нежелательные эффекты сводились к минимуму при уменьшении нагрузки липосом пролекарством до 2.5 мол. % (что соответствует режиму низкодозовой терапии метотрексатом).

7. Исследованы *in vitro* белки плазмы крови человека, ассоциирующие с липосомами. Обнаружено, что связывание фрагментов компонента С3 и фактора Н системы комплемента человека характерно только для липосом с 10 мол. % МТХ-DOG. Различия в профилях связывания белков коррелируют с данными об активации системы комплемента в тестах *in vitro*.

Автор выражает благодарность д.б.н. В.А. Кадыкову (ИБХ РАН) и С.С. Хуцяну (Институт биологии клетки РАН, Пушкино) за проведение исследований с помощью электронной микроскопии, к.б.н. Г.П. Гаенко (ИБХ РАН) за проведение экспериментов с клетками, проф. К. Гранфису (Prof. C. Grandfils, The Interfaculty Centre of Biomaterials (CEIB), University of Liège, Belgium) за сотрудничество и возможность выполнения части работ в его лаборатории, проф. Я. Себени, (Prof. J. Szebeni, Nanomedicine Research and Education Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary) за сотрудничество, к.х.н. А.Г. Востровой (ИБХ РАН) и И.А. Вострову (Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова) за помощь в проведении ВЭЖХ анализа, к.х.н. Н.В. Проказовой (Институт экспериментальной кардиологии, Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва) за предоставленные образцы плазмы крови человека, к.х.н. С.В. Сизовой (ИБХ РАН), д.х.н. Н.С. Мелик-Нубарову (Химический факультет МГУ) за предоставление возможности работать на приборах и ценные советы, к.х.н. Е.Г. Евтушенко (Химический факультет МГУ) за помощь в измерении размеров липосом методом NTA, к.б.н. Е.П. Копанцеву и к.б.н. Е.В. Свирщевской (ИБХ РАН) за помощь в проведении иммуноблоттинга, проф. Р. Брауну (Prof. R. Brown, Hormel Institute, Minnesota University) за любезно предоставленные препараты антител.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Гаенко Г.П., Молотковский Юл.Г. Липосомы с диглицеридным конъюгатом метотрексата: активность в культуре метотрексат-резистентных клеток лейкемии // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33, № 4. С. 470–473.

2. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Молотковский Юл.Г. Липосомы как нано-носители липидных конъюгатов противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата // Российские нанотехнологии. 2008. Т. 3, № 3–4. С. 162–172.

3. Кузнецова Н.Р., Гаенко Г.П., Хайдуков С.В., Бовин Н.В., Водовозова Е.Л. Влияние углеводных лигандов на цитотоксичность липосом с диглицеридным

конъюгатом метотрексата в культурах клеток острой лейкемии человека // Биорганическая химия. 2009. Т. 35, № 4. С. 542–549.

4. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovsky J., and Vodovozova E. Liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan as convenient drug delivery vehicles // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2009. V. 19, № 1. P. 51–59.

5. Kuznetsova N., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N., Vodovozova E., Mészáros T., Szebeni J., and Grandfils C. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer // Journal of Controlled Release. 2012. Doi:10.1016/j.jconrel.2011.12.010 [in press].

Тезисы

6. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Khutsyan S., Gaenko G., Vodovozova E. Characteristics of liposomes loaded with diglyceride esters of methotrexate and melphalan // Abstract book of the 6th International Workshop on Drug Delivery Systems, Liblice Castle, Szech Republic, October 3–6, **2008**, p. 24.

7. Кузнецова Н.Р., Кандыба А.Г., Бовин Н.В., Севрин Ш., Леспино Д., Гранфис К., Водовозова Е.Л. Противоопухолевые липосомы с диглицеридными конъюгатами метотрексата и мелфалана: изучение стабильности и взаимодействий с компонентами крови // Сборник тезисов международной научной конференции по биорганической химии и биотехнологии «IX чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», Москва–Пушино, 28 сентября–2 октября **2009**, Т. 2, стр. 113.

8. Kuznetsova N., Kandyba A., Bovin N., Severin C., Lespineux D., Grandfils C., Vodovozova E. Liposomes Loaded with Diglyceride Esters of Methotrexate and Melphalan: Studies on Stability and Hemocompatibility // Abstracts of the 4th Liposome Advances Conference, The School of Pharmacy, University of London, London, UK, December 12–15, **2009**, p. 81.

9. Kuznetsova N., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N., Grandfils C., Vodovozova E. Hemocompatibility of liposomes loaded with diglyceride esters of methotrexate and melphalan // Abstracts of the 3rd International NanoBio Conference, ETH Zurich, Switzerland, August 24–27, **2010** (<http://www.ecmjournal.org/journal/supplements/vol020supp03/pdf/v020supp03a152.pdf>).

10. Kuznetsova N., Sevrin C., Lespineux D., Grandfils C., Vodovozova E. Liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer: physicochemical properties and hemocompatibility // Abstracts of the Liposomes in Jerusalem–2011 International conference, Izrael, May 15–19, **2011**, p. 197.

11. Кузнецова Н.Р., Севрин Ш., Леспино Д., Гранфис К., Водовозова Е.Л. Физико-химические свойства противоопухолевых липосом с липофильными пролекарствами метотрексата и мелфалана и их гемосовместимость // 2-ая Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина», пансионат «Заря», Московская область, 19–24 сентября **2011**, стр. 51.

12. Кузнецова Н.Р., Свирщевская Е.В., Водовозова Е.Л. Исследование взаимодействий липосом, нагруженных липофильными пролекарствами мелфалана и метотрексата, с белками плазмы крови // Тезисы докладов и стендовых сообщений XXIV зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" Москва, 7–9 февраля **2012**, стр. 93.