

©Коллектив авторов

СИСТЕМА АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ДЛЯ ДОКСОРУБИЦИНА НА ОСНОВЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПЕПТИДА И ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Л.В. Кострюкова¹, Ю.А. Терешкина^{1}, Е.И. Короткевич¹, В.Н. Прозоровский¹,
Т.И. Торховская¹, Г.Е. Морозевич¹, И.Ю. Торопыгин¹, М.А. Константинов^{1,2}, Е.Г. Тихонова¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: bugova13@gmail.com

²Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Доксорубин — один из широко известных и часто применяемых химиопрепаратов для лечения различных типов рака, использование которого затруднено из-за его высокой кардиотоксичности. Для снижения побочных проявлений разрабатываются системы адресной доставки лекарств. Одним из перспективных компонентов в качестве векторных молекул (лигандов) служат NGR-содержащие пептиды, аффинные к рецептору CD13, который экспрессируется на поверхности многих опухолевых клеток и кровеносных сосудов опухоли. Ранее был разработан способ получения композиции доксорубина, встроенного в фосфолипидные наночастицы с адресным фрагментом, в форме ультратонкой эмульсии. Полученная композиция характеризовалась малым размером частиц (менее 40 нм) и высокой степенью встраивания доксорубина (около 93%) в транспортные наночастицы. При оценке проникающей способности и степени связывания с поверхностью клеток фибросаркомы (HT-1080) в данной работе было показано, что при добавлении к клеткам композиции, содержащей адресный фрагмент, уровень доксорубина был выше практически в 2 раза по сравнению с липосомальной формой доксорубина, то есть лекарство в системе с адресным пептидом лучше проникало в клетку. При этом на контрольной линии клеток аденокарциномы молочной железы (MCF-7), не экспрессирующих на поверхности рецептор CD13, достоверной разницы в уровне доксорубина в клетках отмечено не было. Полученные данные свидетельствуют о перспективности направленной доставки доксорубина к опухолевым клеткам при использовании пептидного конъюгата, содержащего NGR-мотив.

Ключевые слова: фосфолипидные наночастицы; доксорубин; NGR-содержащий пептид; цитотоксичность; проникающая способность

DOI: 10.18097/PBMC20206606464

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются важной проблемой в мире. Одной из наиболее актуальных задач в лечении онкологии является целенаправленная (адресная) доставка лекарственных соединений к клеткам опухоли с последующей их деструкцией. В связи с этим разрабатываются системы доставки для лекарственных соединений.

Широко известной системой доставки лекарств являются липосомы, обладающие несколькими отличительными характеристиками по сравнению с другими системами доставки лекарств, такими как биосовместимость, отсутствие иммуногенности, способность к самосборке. Липосомы способны переносить и защищать инкапсулированные в них препараты от внешней среды, снижать токсичность инкапсулированных препаратов и их воздействие на чувствительные ткани, а также улучшать проникновение в ткани [1]. Они позволяют переносить как липофильные, амфифильные, так и гидрофильные соединения [2], а сходство с бислоем клеточной стенки позволяет осуществлять доставку непосредственно в клетку опухоли. Однако высвобождение лекарств из традиционных липосом происходит медленно и неконтролируемо [3]; при этом в кровотоке такие липосомы могут подвергаться быстрой деградациии фагоцитарными клетками ретикулоэндотелиальной

системы (РЭС) [1]. Ранее нами было показано положительное влияние липосом на биодоступность лекарственных соединений [4-6].

В литературе широко освещается возможность использования в качестве адресного фрагмента пептидов, содержащих NGR-мотив (аспарагин-глицин-аргинин) и аффинных к аминопептидазе N (CD13). Данный рецептор обнаружен в опухоли и в ангиогенных кровеносных сосудах опухоли; он играет ключевую роль в ангиогенезе, инвазии, пролиферации клеток и считается идеальной мишенью для селективной доставки противоопухолевых препаратов [7]. Мотив NGR представляет собой “самонаводящийся на опухоль” пептид, который может связываться с изоформой CD13, экспрессируемой на кровеносных сосудах опухоли [8]. Лекарства и нагруженные лекарственным средством наночастицы, модифицированные NGR, могут улучшить их биораспределение и терапевтический эффект в опухолевых участках. Поэтому NGR-лиганды можно использовать для модификации поверхности наночастицы для улучшения способности нацеливания на опухолевые клетки [9]. Благодаря своей низкой молекулярной массе, простоте синтеза и селективному средству к клеточным мишеням опухолевой неоваскулатуры, NGR представляет собой благоприятный “самонаводящийся на опухоль” мотив для целевой терапии рака [10].

Доксорубин (Dox) — один из широко используемых химиотерапевтических препаратов для лечения онкологических заболеваний, таких как острый лимфобластный и миелобластный лейкоз, злокачественная лимфома, саркома мягких тканей и костей, рак молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, желудка и бронхогенный рак [11]. Механизм действия Dox направлен на ингибирование синтеза ДНК и РНК путём интеркалирования между парами оснований цепи ДНК/РНК [12]. Однако генерируемые Dox свободные радикалы вызывают кардиотоксичность, что побуждает к разработке адресных систем доставки [13].

Цель данной работы — оценить влияние фосфолипидной наносистемы транспорта, содержащей адресный фрагмент, представляющий собой NGR-содержащий пептид, на проникающую способность Dox в экспериментах *in vitro* в сравнении с действием такой же системы без адресного компонента (NPh-Dox).

МЕТОДИКА

Получение и характеристика композиции

Для получения наночастиц использовали соевый фосфатидилхолин Lipoid S100 (“Lipoid”, США). Dox в виде гидрохлорида был предоставлен компанией “Омутнинская научная опытно-промышленная база” (Россия). Получение композиции с адресным компонентом проводили аналогично методике [13] с использованием плёночного метода. Конъюгат DSPE-PEG2000-NGR получали согласно методике, описанной в работах [13, 14], с небольшой модификацией, используя молярное соотношение основных компонентов DSPE-PEG2000-Mal : NGR 4,3:1. Для этого использовали NGR-содержащий гексапептид с последовательностью (NH₂-)Gly-Asn-Gly-Arg-Gly-Cys(-COOH) — CGRGNG (“СинтонЛаб”, Россия) и фосфолипид дистеароил-фосфатидилэтаноламин (DSPE), конъюгированный с ПЭГ2000 и малеимидом — DSPE-PEG2000-Mal (“Avanti”, США) в виде водорастворимых солей.

Размер частиц в полученных композициях определяли методом динамического светорассеяния и измерением ζ-потенциала методом электрофоретического рассеяния света на анализаторе Zetasizer Nano ZS (“Malvern”, Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZETASIZER 6.20.

Процент встраивания Dox в фосфолипидные наночастицы контролировали методом ультрафильтрации при помощи микрофильтров VivaSpin (“Sartorius AG”, Германия). Концентрацию Dox определяли с использованием хроматографической системы для ВЭЖХ Agilent 1100 Series (“Agilent Technologies”, США) [15].

Клеточные культуры

В исследовании были использованы клеточные линии фибросаркомы человека HT-1080, полученные в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва) и

аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и поддерживаемые в коллекции клеточных культур Института биомедицинской химии. Культивирование опухолевых клеток проводили согласно рекомендациям, указанным в сертификате культуры клеток, с использованием соответствующих сред с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“ПанЭко”, Россия) [16]. Клетки культивировали при 37°C во влажной атмосфере с содержанием 5% CO₂ (CO₂-инкубатор “Binder”, Германия). В работе использовали клеточные линии от 3 до 10 пассажей.

Оценка клеточного связывания и проникающей способности

Клетки (10⁶ на лунку) рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. В качестве препарата сравнения использовали фосфолипидную наноформу Dox (NPh-Dox). Образцы композиций добавляли в концентрации 14 мкг/мл (в пересчёте на Dox) и инкубировали в течение 4 ч в двух температурных режимах: 37°C в CO₂-инкубаторе (“Sanyo”, Япония) и 4°C в холодильнике (“Atlant”, Беларусь). После инкубации среду с исследуемыми композициями удаляли и клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером (“ПанЭко”).

Экстракцию Dox проводили раствором 0,1% муравьиной кислоты (“Sigma”, США) в ацетонитриле (“Fisher Scientific”, Великобритания) из расчёта 1 мл на лунку. Полученные экстракты центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин (при 4°C) (Eppendorf 5810R, ротор FA-45-30-11, “Eppendorf”, Германия). Определение содержания Dox в образцах проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1200 Series с колонкой Eclipse XDB-C18 (“Agilent Technologies”) и масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS (“Agilent Technologies”) [15]. Содержание Dox в клетках нормировали на уровень белка (мг), определяемого методом Лоури. Полное проникновение Dox в клетку (интернализацию) рассчитывали по разности его содержания при 37°C (общее накопление в клетках) и при 4°C, так как ранее было показано, что при 4°C взаимодействие пептида с клеткой ограничивается его ассоциацией с наружной клеточной мембраной, а проникновение его в клетку происходит при более высоких температурах [17].

При проведении статистического анализа достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что противоопухолевые агенты, встроенные в наночастицы, характеризуются наибольшим накоплением в опухоли по сравнению с классическими или свободными препаратами за счёт эффекта повышенной проницаемости и удерживания (так называемый EPR effect) [18, 19]. Полученная композиция NPh-Dox-NGR представляла собой ультратонкую эмульсию. Анализ с использованием

метода динамического рассеяния света показал, что липосомальные наночастицы эмульсии имели среднее значение размера $33,2 \pm 3,2$ нм. Добавление специфического пептида к системе транспорта приводило к увеличению размера фосфолипидных наночастиц в пределах допустимых значений; так, размер частиц фосфолипидной наночастицы Dox не превышал 20 нм [4]. Столь малый размер частиц позволяет им преодолевать ряд барьеров в организме на пути к клетке-мишени, а также легче проникать через увеличенные поры стенок сосудов опухоли [20]. Всё это повышает накопление в опухоли лекарственного соединения. Следовательно, можно ожидать, что полученные наночастицы с Dox и адресным пептидом, аналогично NPh-Dox, также будут обладать конкурентным преимуществом по сравнению с традиционной формой химиотерапевтических препаратов.

Другими важными параметрами, отражающими стабильность наночастиц и их ёмкость, являются ζ -потенциал и процент включения лекарственного вещества. Показатель ζ -потенциала характеризует устойчивость коллоидной системы: чем выше значение данного показателя, тем устойчивее система. Для исследуемой композиции NPh-Dox-NGR показатель ζ -потенциала составлял $6,32 \pm 1,1$ мВ.

При определении уровня встроенного Dox в фосфолипидные наночастицы с адресным фрагментом в виде пептида, содержащего NGR-мотив, процент встраивания составлял $93,1 \pm 0,1\%$.

Оценку проникающей способности Dox в составе фосфолипидных наночастиц со специфическим пептидом проводили на CD13-положительной клеточной линии HT-1080, поскольку адресный конъюгат, содержащий NGR-мотив, обладает сродством именно к этому рецептору. В качестве отрицательного контроля использовали клетки MCF-7 (CD13-отрицательные клетки, у которых отсутствует экспрессия аминопептидазы N [21]). После 4 ч инкубации клеточных культур с NPh-Dox и NPh-Dox-NGR было показано, что наличие специфического пептида, содержащего NGR-мотив в композиции, способствует практически двукратному превышению общего накопления Dox в клетках HT-1080 по сравнению с фосфолипидной формой Dox (рисунок, А). Также наблюдалось увеличение проникающей способности Dox при использовании адресного конъюгата в системе доставки.

На CD13-отрицательных клетках MCF-7 (контроль) было показано, что различия как в общем накоплении, так и в интернализации, находились в пределах ошибки и достоверной разницы не выявлено (рисунок, Б), то есть в эксперименте с данными клетками видимого действия адресного конъюгата не наблюдалось. Аналогичные результаты нами были получены с фосфолипидной композицией хлорина еб в эксперименте с двумя клеточными линиями (HepG2 и MCF-7) [22]. Полученные данные подтверждают значимость экспрессии

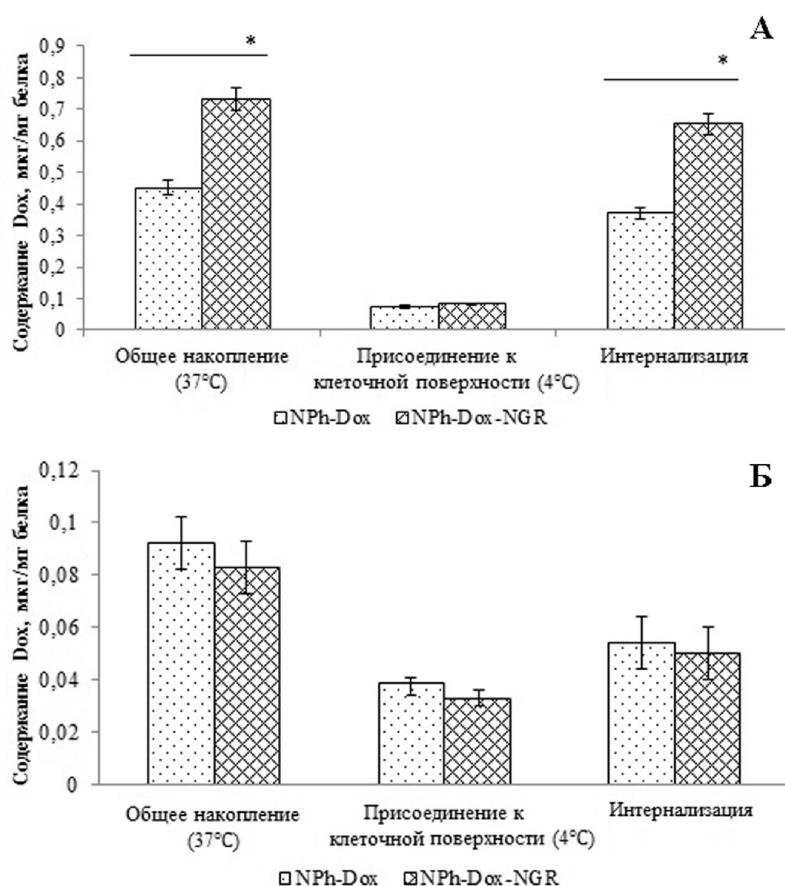


Рисунок. Накопление доксорубина в культурах клеток HT-1080 (А) и MCF-7 (Б) после 4 ч инкубации с исследуемыми композициями. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

аминопептидазы N (CD13) и возможность использования этого белка в качестве мишени для направленной доставки. В свою очередь, использование адресного конъюгата, содержащего NGR-мотив, в составе фосфолипидных наночастиц для доставки Dox может существенно повысить накопление лекарственного соединения непосредственно в клетках опухоли, не затрагивая здоровые ткани и органы, что позволит свести к минимуму побочные проявления данного соединения. Однако для более полного понимания механизма действия и “поведения” подобной системы в организме требуется ряд дальнейших исследований, которые позволят с уверенностью подтвердить эффективность и безопасность такой системы адресной доставки для цитостатиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Неспецифическое распределение по органам и тканям и недостаточное накопление терапевтических средств в ткани-мишени остаются серьёзной проблемой при разработке новых лекарственных соединений, особенно применяемых в онкологии. Чтобы успешно преодолеть эти препятствия при доставке лекарств в организм, необходимо снабжение классических наночастиц адресными компонентами. В нашей работе была предпринята попытка придать ранее разработанной фосфолипидной наносистеме адресное действие за счёт присоединения пептида, содержащего NRG-мотив, аффинный к рецептору аминопептидазе N (CD13). Выбор данного вектора был обусловлен повышенной экспрессией CD13-рецепторов на поверхности опухолевых клеток и их сосудов [7, 21]. Для реализации работы был проведен синтез конъюгата NGR-содержащего пептида с фосфолипидным компонентом DSPE-PEG2000-Mal с образованием тиоэфирной связи. Такая система препятствует преждевременной деградации фосфолипидных частиц и повышает процент накопления вещества в клетках-мишенях как за счёт использования ПЭГа, так и за счёт образования вышеназванной связи [20, 23]. Размер частиц в полученной композиции составляет менее 40 нм, что обуславливает её преимущества перед препаратами без системы транспорта в преодолении различных барьеров (РЭС, гемато-энцефалического и др.). Высокий уровень встроенного Dox в наночастицы был подтвержден соответствующим методом [15].

При изучении клеточного проникновения отмечено, что на культуре клеток MCF-7 существенного различия между композициями не наблюдалось. Однако в эксперименте после инкубации с композицией Dox в фосфолипидных наночастицах с пептидом, содержащим NGR-мотив, с культурой клеток HT-1080 происходило увеличение общего накопления и интернализации Dox. Можно предположить, что в дальнейшем эффект от лечения такой композицией будет значительнее, так как адресный компонент позволит лекарству проникать направленно в опухолевые клетки, тем самым снизив побочные проявления Dox.

В заключение следует отметить, что разработанная адресная наносистема перспективна для более безопасной и эффективной доставки Dox с целью специфического лечения рака, однако требуется её дальнейшее всестороннее исследование.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны сотрудникам Центра коллективного пользования “Протеом человека” за анализ пептидного конъюгата.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013-2020 годы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zununi S.V., Salehi R., Davaran S., Sharifi S. (2017) Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl., **71**, 1327-1341.
2. Khan A.A., Allemailem K.S., Almatroodi S.A., Almatroudi A., Rahmani A.H. (2020) 3 Biotech., **10**(4), 163. DOI: 10.1007/s13205-020-2144-3
3. Deng Y., Huang H., Chen M., Chen G., Zou W., Zhao Y., Zhao Q. (2020) Molecules, **25**(5), 1098. DOI: 10.3390/molecules25051098
4. Медведева Н.В., Проzorovский В.Н., Игнатов Д.В., Дружилловская О.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. (2015) Биомедицинская химия, **61**(2), 219-230. [Medvedeva N.V., Prozorovskiy V.N., Ignatov D.V., Druzilovskaya O.S., Kudinov V.A., Kasatkina E.O., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2015) Biomeditsinskaya Khimiya, **61**(2), 219-230.]
5. Kostyukova L.V., Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Ipatova O.M. (2018) FEBS Open Bio, **8**(2), 201-210.
6. Enyedi K.N., Toth S., Szakacs G., Mezo G. (2016) PLoS One, **12**(6), e0178632. DOI: 10.1371/journal.pone.0178632
7. Zheng Y.-B., Gong J.-H., Liu X.-J., Li Y., Zhen Y.-S. (2017) Molecular. Carcinogenesis, **56**(5), 1395-1404.
8. Xie X., Yang Y., Yang Y., Zhang H., Li Y., Mei X. (2015) Drug Delivery, **23**(7), 2445-2456.
9. Seidi K., Jahanban-Esfahlan R., Monhemi H., Zare P., Minofar B., Daei Farshchi Adli A., Farajzadeh D., Behzadi R., Mesgari Abbasi M., Neubauer H.A., Moriggl R., Zarghami N., Javaheri T. (2018) Oncogene, **37**(29), 3967-3980.
10. Rolle F., Bincoletto V., Gazzano E., Rolando B., Lollo G., Stella B., Riganti C., Arpicco S. (2020) Int. J. Pharm., **580**, 119191. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119191
11. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. (2004) Pharmacol. Rev., **56**(2), 185-229.
12. Chen Y., Wu J.J., Huang L. (2010) Mol. Ther., **18**(4), 828-834.

13. Прозоровский В.Н., Кострюкова Л.В., Короткевич Е.И., Торховская Т.И., Морозевич Г.Е., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**(4), e00063. [Prozorovskiy V.N., Kostryukova L.V., Korotkevich E.I., Torkhovskaya T.I., Morozovich G.E., Tikhonova E.G., Ipatova O.M. (2018) Biomedical Chemistry: Research and Methods, **1**(4), e00063.] DOI: 10.18097/BMCRM00063
14. Yang Y., Yang Y., Xie X., Cai X., Zhang H., Gong W., Wang Z., Mei X. (2014) Biomaterials, **35**(14), 4368-4381.
15. Зыкова М.А., Ипатова О.М., Прозоровский В.Н., Медведева Н.В., Воскресенская А.А., Захарова Т.С., Торховская Т.И. (2011) Биомедицинская химия, **57**(2), 174-179. [Zykova M.A., Ipatova O.M., Prozorovskii V.N., Medvedeva N.V., Voskresenskaya A.A., Zakharova T.S., Torkhovskaya T.I. (2011) Biomeditsinskaya Khimiya, **57**(2), 174-179.]
16. Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A., Morozova N.B., Pankratov A.A., Plyutinskaya A.D., Feofanov A.V., Chissov V.I., Zebrev A.I., Tikhomirova A.V. (2012) Guide to Preclinical Drug Research (Mironov A.N. et al., eds.), Grif and Co., Moscow, pp. 655-669.
17. Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Gariepy J. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**(6), 2056-2060.
18. Greish K. (2010) Methods Mol. Biol., **624**, 25-37.
19. Golombek S.K., May J. N., Theek B., Appold L., Drude N., Kiessling F., Lammers T. (2018) Adv. Drug Delivery Revs., **130**, 17-38.
20. Allen T.M., Cullis P.R. (2013) Adv. Drug Delivery Revs., **65**(1), 36-48.
21. Hou L., Zhao X., Wang P., Ning Q., Meng M., Liu C. (2013) PLoS One, **8**(1), e53491. DOI: 10.1371/journal.pone.0053491
22. Кострюкова Л.В., Плютинская А.Д., Панкратов А.А., Короткевич Е.И., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Торховская Т.И., Терешкина Ю.А. (2019) Биомедицинская химия, **65**(6), 507-512. [Kostryukova L.V., Plyutinskaya A.D., Pankratov A.A., Korotkevich E.I., Prozorovskiy V.N., Tikhonova E.G., Torkhovskaya T.I., Teryoshkina Yu.A. (2019) Biomeditsinskaya Khimiya, **65**(6), 507-512.]
23. Petrilli R., Eloy J.O., Lee R.J., Lopez R.F.V. (2018) Recombinant Glycoprotein Production, **1674**, 229-237.

Поступила в редакцию: 02. 09. 2020.
После доработки: 04. 09. 2020.
Принята к печати: 01. 12. 2020.

TARGETED DRUG DELIVERY SYSTEM FOR DOXORUBICIN BASED ON A SPECIFIC PEPTIDE AND PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES

**L.V. Kostryukova¹, Y.A. Tereshkina^{1*}, E.I. Korotkevich¹, V.N. Prozorovskiy¹,
T.I. Torkhovskaya¹, G.E. Morozovich¹, I.Y. Toropygin¹, M.A. Konstantinov^{1,2}, E.G. Tikhonova¹**

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; * e-mail: burova13@gmail.com
²Pirogov Medical University, 1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia

Doxorubicin is one of the widely known and frequently used chemotherapy drugs for the treatment of various types of cancer, the use of which is difficult due to its high cardiotoxicity. Targeted drug delivery systems are being developed to reduce side effects. One of the promising components as vector molecules (ligands) are NGR-containing peptides that are affinity for the CD13 receptor, which is expressed on the surface of many tumor cells and tumor blood vessels. Previously, a method was developed for preparing a composition of doxorubicin embedded in phospholipid nanoparticles with a targeted fragment in the form of an ultrafine emulsion. The resulting composition was characterized by a small particle size (less than 40 nm) and a high degree of incorporation of doxorubicin (about 93%) into transport nanoparticles. When assessing the penetrating ability and the degree of binding to the surface of fibrosarcoma cells (HT-1080), it was shown that when the composition with the targeted fragment was added to the cells, the level of doxorubicin was almost 2 times higher than that of the liposomal form of doxorubicin, i.e. the drug in the system with the targeted peptide penetrated the cell better. At the same time, on the control line of breast adenocarcinoma cells (MCF-7), which do not express the CD13 receptor on the surface, there was not significant difference in the level of doxorubicin in the cells. The data obtained allow us to draw preliminary conclusions about the prospects of targeted delivery of doxorubicin to tumor cells when using a peptide conjugate containing an NGR motif and the further need for its comprehensive study.

Key words: phospholipid nanoparticles; doxorubicin; NGR-containing peptide; cytotoxicity; penetrating ability

Funding. The work is done in the framework of the State Academies of Sciences fundamental research program for 2013-2020.

Received: 02.09.2020, revised: 04.09.2020, accepted: 01.12.2020.