

УДК 615.011.4 577
©Коллектив авторов

УВЕЛИЧЕНИЕ ЭНДОЦИТОЗА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ С АДРЕСНЫМ ФРАГМЕНТОМ

*Л.В. Кострюкова, М.А. Санжаков, Д.В. Игнатов, В.Н. Прозоровский, О.С. Дружиловская,
Е.С. Касаткина, Н.В. Медведева*, О.М. Ипатова*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: +7(499) 2469491, +7(495)7083807;
эл. почта: nmedvedeva@ibmc.msk.ru

Известно, что нарушение в функционировании клеток органов/тканей сопровождается повышенной экспрессией тех или иных рецепторов. Современным подходом для повышения специфичности накопления лекарственных соединений в области поражения является конструирование транспортных систем, снабженных адресным фрагментом. Направленный транспорт позволяет снижать дозу вводимого лекарственного средства, за счёт чего минимизировать его воздействие на здоровые клетки (снизить побочные проявления). Такой подход особенно важен в онкологии из-за высокой токсичности используемых препаратов. В настоящей работе получены и охарактеризованы лекарственные композиции доксорубина и хлорина е6 в составе коллоидных наночастиц с синтезированными ранее адресными фрагментами на основе фолиевой кислоты и биотина. В экспериментах на культуре клеток Her G2 показано, что включение исследуемых лекарственных препаратов в фосфолипидные наночастицы, снабжённые адресными фрагментами, приводит к достоверному увеличению их интернализации.

Ключевые слова: направленный транспорт, Her G2, фолиевая кислота, биотин, внутриклеточная интернализация, доксорубин, хлорин е6

DOI 10.18097/PBMC20166203306

ВВЕДЕНИЕ

Одной из причин побочных эффектов лекарств является неспецифичность их распределения в организме. Конструирование систем для адресной доставки лекарств в организме позволяет повысить их терапевтическую эффективность и снизить побочные эффекты. При этом достигается повышение биодоступности за счёт улучшения всасывания и обеспечения терапевтической концентрации в области поражения/воспаления при меньших вводимых дозах, оптимизируется фармакокинетика и распределение по органам и тканям. Наиболее распространёнными являются системы транспорта на основе липидов – липосомы [1]. По данным Vozzuto и соавт., 12 препаратов, снабженных липосомальной системой транспорта, уже присутствуют на фармацевтическом рынке, более 50 находятся на разных стадиях исследования и клинических испытаний [2]. Основным компонентом таких систем являются фосфолипиды. Их преимущество заключается в том, что они биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, а также легко модифицируются для придания тех или иных свойств.

Нарушение в функционировании клеток органов/тканей сопровождается повышенной экспрессией тех или иных рецепторов в сравнении со здоровыми клетками [3-5]. Так, для интенсивно делящихся опухолевых клеток значительно возрастает потребность в ряде веществ, в том числе в фолиевой кислоте и биотине, и именно поэтому данные соединения наиболее часто используются в качестве векторов при конструировании адресных фрагментов

для направленного транспорта. Повышение специфичности накопления лекарства в органе/ткани мишени за счёт снабжения его адресной транспортной системой особенно важно в онкологии в связи с высокой токсичностью используемых препаратов [6].

Ранее нами для ряда лекарств было показано, что их включение в состав транспортной наносистемы на основе растительных фосфолипидов сопровождается увеличением биодоступности и специфической активности [7]. Дальнейшее повышение специфичности распределения лекарств может быть достигнуто путём снабжения композиции лекарство-транспортная наносистема адресным фрагментом. При этом следует иметь в виду, что модификация непосредственно лекарственного соединения может снижать его специфическую активность, а модификация поверхности транспортирующей наночастицы может привести к изменению таких её свойств, как стабильность, поверхностный заряд, ёмкость для транспортируемого лекарства и т.д. Для получения эффективной системы и сохранения свойств лекарства и наночастицы нами был предложен подход, при котором без использования какой-либо необратимой химической реакции лекарство и адресный фрагмент “встраиваются” в коллоидную транспортную наночастицу. Для этого были синтезированы адресные конъюгаты фолиевой кислоты и биотина с додециламином [8], который обеспечивает их встраивание в фосфолипидную матрицу.

Целью настоящей работы было на примере доксорубина и хлорина е6 сравнить изменение эффективности рецептор-опосредованного эндоцитоза при их включении в состав коллоидных

наночастиц на основе растительных фосфолипидов с адресными конъюгатами в экспериментах на культуре клеток Нер G2.

МЕТОДИКА

В работе использовали нормализованный солевой фосфатный буфер (PBS) (“ПанЭко”, Россия), бычий сывороточный альбумин (“Sigma-Aldrich”, США), питательные среды для культивирования и инкубации клеток DMEM/F12 (“Gibco”, США), эмбриональную телячью сыворотку (“Gibco”, США), пенициллин/стрептомицин (“Gibco”, США), реактивы для определения белка по Лоури (“Синтакон”, Россия), хлорин еб-стандарт (“Frontier Scientific”, США), муравьиную кислоту 98-100% (“Merck KGaA”, Германия), трифторуксусную кислоту ($\geq 99,5\%$, “Fluka Chemie AG”, Швейцария), фосфолипид Lipoid S100 (“Lipoid GmbH”, Германия), а также субстанции – хлорин еб в виде N-метил-D-глюкаминового соли (ФГБОУ ВПО “ИГХТУ”, Россия) и доксорубин гидрохлорид (“Long Sheng”, Китай) – и их конъюгаты с додециламином, полученные согласно [8]. Все растворители для ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа были высокой степени чистоты: метанол – HPLC grade (“Fisher Scientific”, Великобритания); ацетонитрил – HPLC for UV (“Acros organics”, США).

Доксорубин (ДОКС) и хлорин еб (Е6) (по 2,5 мг/мл) в составе фосфолипидных наночастиц с адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин (ФД) или биотин-додециламин (БД) (0,1 мг/мл) получали гомогенизацией при 45°C и давлении 1000 атм в циклическом режиме (5-7 циклов) на микрофлюидизере M110EH30K (“Microfluidics”, США) суспензии фосфотидилхолина Lipoid S100 (ФХ) (25 мг/мл) в 10%-ном растворе мальтозы (криопротектор). Полученную эмульсию пропускали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, разливали во флаконы тёмного стекла по 10 мл и лиофилизовали на лиофильной сушке Virtis AdVantage XL (“Virtis”, США). Для экспериментов с клетками доксорубин и хлорин еб, а также их лекарственные композиции в составе коллоидных наночастиц, снабжённых адресным фрагментом, разводили до концентрации 14 мкг/мл (по действующему веществу) PBS.

Размер и дзета-потенциал (ζ -потенциал) наночастиц фосфолипидных композиций исследуемых лекарств определяли методом динамического рассеяния света на анализаторе Zetasizer Nano ZS (“Malvern”, Великобритания).

Клетки гепатобластомы человека линии Нер G2 были получены из American Type Culture Collection (США). Клетки культивировали при стандартных условиях (5% CO₂, 37°C) в 75 см²-флаконах в среде DMEM/F12 с 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS) и 100 единицами/мл пенициллина/стрептомицина (“Gibco”, США) в CO₂-инкубаторе MCO-17AIC (“Sanyo”, Япония). За сутки до эксперимента клетки высевали

в шестилучные культуральные планшеты (“Corning”, США) со средой DMEM/F12 при плотности 1×10^6 клеток на лунку и оставляли на 24 ч. После трёхкратной промывки раствором PBS в лунки заливали по 3 мл инкубационной смеси, содержащей лекарство в свободном виде или в составе коллоидных наночастиц с адресным фрагментом. Планшеты инкубировали при 37°C или 4°C в течение 30 мин. После трёхкратной промывки клеток 2 мл холодного (4°C) буфера экстракцию связавшегося с клетками лекарства осуществляли добавлением в лунку 1 мл 0,1% метанольного раствора муравьиной кислоты. Метанольные экстракты центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин на центрифуге Eppendorf 5810 R (“Eppendorf”, Германия, ротор FA-45-30-11). Супернатант анализировали на содержание исследуемого лекарственного вещества с использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Количество неспецифически связавшегося и прошедшего внутрь клеток лекарства нормировали на содержание клеточного белка в лунке.

После экстракции метанолом для определения клеточного белка в каждую лунку добавляли по 1 мл 1M раствора NaOH и оставляли на 16-20 ч при комнатной температуре. Содержание белка в полученных образцах определяли методом Lowry [9] с использованием БСА в качестве стандарта.

Определение доксорубина и хлорина еб проводили с использованием ВЭЖ хроматографа Agilent 1200 Series с масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS с использованием колонки Eclipse XDB-C18 с размером 4,6x150 мм и дисперсностью сорбента 5 мкм (“Agilent Technologies”, США), подвижная фаза 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (В). Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Условия хроматографирования для анализа содержания хлорина еб были следующие: линейный градиент В от 70 до 90% за 3 мин, затем 90% В в течение 7 мин с детекцией молекулярного иона с m/z 597,3. Время удерживания составляло 6,4 мин. При масс-спектрометрическом детектировании доксорубина режим элюирования образца был следующий: линейный градиент В с 10 до 90% за 10 мин, затем 1 мин 90% В. Детектировали молекулярный ион доксорубина с m/z 544,2. Время удерживания – 8,5 мин. Для количественного определения хлорина еб и доксорубина были построены соответствующие калибровочные зависимости.

Статистическую обработку результатов производили, используя критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используемые в работе лекарственные субстанции доксорубин (ДОКС) – антибиотик антрациклинового ряда – и хлорин еб (Е6) (рис. 1) широко применяются в онкологической клинической

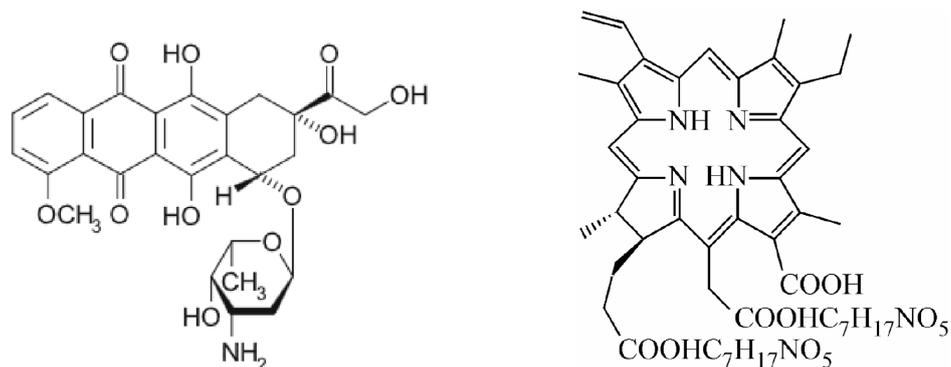


Рисунок 1. Структурные формулы доксорубина (слева) и глюкаминовой соли хлорина е6 (справа).

практике для терапии, а последний также и для диагностики злокачественных новообразований. Полученные на их основе лекарственные композиции, представляющие собой коллоидные наночастицы со встроенным лекарством и адресным конъюгатом, были охарактеризованы по размеру частиц и дзета-потенциалу. Измерения показали, что основная доля частиц (90-96%) композиций имеет диаметр около 15 нм. При этом методом ультрафильтрации (результаты не приводятся) показано, что более 90% лекарственного вещества встроено в наночастицы. Дзета-потенциал наночастиц полученных композиций (плотность поверхностного заряда) зависит как от транспортируемого ими лекарства, так и от вектора – фолиевой кислоты или биотина. Так, лекарственные композиции с ДОКС имеют положительный заряд, а с Е6 – отрицательный. ДОКС и адресный конъюгат на основе фолиевой кислоты с додециламином (ФД) содержат положительно заряженные NH_2 -группы, что определяет заряд композиций в целом: дзета-потенциал композиции ФХ-ДОКС-ФД ($20,9 \pm 1,2$) мВ, ФХ-ДОКС-БД – ($14,3 \pm 0,6$) мВ. Хлорин е6 в виде N-метилглюкаминовой соли и адресный конъюгат на основе биотина с додециламином (БД) электронейтральны и при их встраивании знак поверхностного заряда отрицательный: дзета-потенциалы композиций ФХ-Е6-ФД и ФХ-Е6-БД равны ($-17,7 \pm 1,0$) мВ и ($-16,1 \pm 1,0$) мВ, соответственно.

Для сравнительного изучения эндоцитоза лекарств в составе композиций, снабженных адресными конъюгатами, нами была использована клеточная линия Нер G2, которая является общепринятой моделью для первичного тестирования потенциальных противоопухолевых препаратов *in vitro* [10]. В экспериментах на культуре клеток, помимо рецепторного связывания с последующим эндоцитозом, наблюдается неспецифическая сорбция исследуемых веществ на поверхности клеток [11]. В работах [12, 13] показано, что рецепторный эндоцитоз является температурно-зависимым и при температуре 4°C происходит только неспецифическое связывание с поверхностью клеток. В связи с этим сравнение эффективности внутриклеточного прохождения ДОКС и Е6 при их включении в состав фосфолипидных наночастиц с адресными конъюгатами проводили при температурах 4°C и 37°C . При этом количество лекарства, вошедшего внутрь клетки за счёт рецепторного эндоцитоза, оценивали по разности количества лекарства, связавшегося с клетками при температуре 37°C и 4°C с нормировкой на количество клеточного белка.

В таблице приведены результаты экспериментов по исследованию связывания доксорубина и хлорина е6 после 30-мин инкубации клеток Нер G2 в присутствии свободных ДОКС или хлорина е6 и их лекарственных композиций в составе коллоидных наночастиц с конъюгатами додециламина с фолиевой

Таблица. Связывание доксорубина (ДОКС) и хлорина е6 (Е6) клетками Нер G2 (мкг/г клеточного белка) после 30-минутной инкубации с субстанциями в свободном виде и в составе коллоидных наночастиц с адресными фрагментами на основе фолиевой кислоты и биотина при 4°C и 37°C

Температура инкубации	Субстанция, лек. форма	Связывание ДОКС, мкг/г клеточного белка			Связывание Е6, мкг/г клеточного белка		
		ДОКС своб.	ФХ-ФД-ДОКС	ФХ-БД-ДОКС	Е6 своб.	ФХ-ФД-Е6	ФХ-БД-Е6
4°C *		$3,95 \pm 0,39$	$4,25 \pm 0,46$	$3,77 \pm 0,38$	$0,45 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,03$
37°C **		$4,38 \pm 0,44$	$5,10 \pm 0,29$	$4,38 \pm 0,44$	$0,60 \pm 0,04$	$0,95 \pm 0,07$	$0,70 \pm 0,07$

Примечание: ФХ-ФД-ДОКС/Е6 и ФХ-БД-ДОКС/Е6 - ДОКС или Е6 в составе коллоидных наночастиц с конъюгатами додециламина с фолиевой кислотой и биотином в качестве адресных фрагментов, соответственно. * - поверхностное неспецифическое связывание лекарства. ** - поверхностное неспецифическое связывание + внутриклеточная интернализация лекарства.

кислотой и биотином в качестве адресных фрагментов. Из представленных в таблице данных видно, что при 37°C для исследуемых композиций и свободных доксорубина/хлорина е6 связывание субстанций больше, чем при 4°C. При этом неспецифическое связывание (превышение связывания при 37°C над таковым при 4°C) для ДОКС составляет от 83 до 90%, для хлорина е6 – от 45 до 76%.

На рисунке 2 приведены результаты по определению количества лекарственных субстанций, прошедших внутрь клеток Нер G2 посредством рецепторного эндоцитоза, после их инкубации с ФХ-БД-ДОКС и ФХ-ФД-ДОКС (рис. 2А) и с ФХ-БД-Е6 и ФХ-ФД-Е6 (рис. 2Б) относительно количества лекарств, прошедшего внутрь клеток при инкубации со свободными ДОКС и Е6, принятого за 100%.

Из рисунка 2А видно, что при инкубации клеток Нер G2 с композициями ДОКС в составе коллоидных наночастиц с адресными фрагментами в виде конъюгатов додециламина с фолиевой кислотой и биотином наблюдается достоверно большая интернализация ДОКС, чем при инкубации со свободным ДОКС ($p < 0,05$). Для хлорина е6 также наблюдается увеличение внутриклеточного связывания Е6 в результате инкубации с лекарственными композициями с адресными фрагментами (рис. 2Б). Однако, в сравнении со свободным Е6 достоверность отличия в наночастицах с вектором на основе конъюгата биотин-додециламин ($p < 0,1$) меньше, чем для конъюгата фолиевой кислоты с додециламином ($p < 0,05$). Приведенные результаты свидетельствуют о том, что интернализация ДОКС и Е6 за счёт

рецептор-опосредованного эндоцитоза при инкубации клеток Нер G2 с лекарственными субстанциями, включёнными в наночастицы, снабжённые адресными конъюгатами, в сравнении со свободным ДОКС и Е6 увеличивается.

ВЫВОДЫ

В результате проведённых экспериментов *in vitro* на примере доксорубина и хлорина е6 показано, что снабжение биологически активных веществ транспортной системой на основе фосфолипидных наночастиц с адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин и биотин-додециламин способно повысить прохождение лекарственного соединения внутрь клеток, на которых экспрессируются рецепторы с высоким сродством к соответствующему вектору. Следует отметить, что величина эффекта зависит как от величины поверхностного заряда транспортных наночастиц, так и используемого вектора: 1) поверхностный заряд наночастиц композиций ДОКС с адресными фрагментами положительный, что способствует их взаимодействию с отрицательно заряженной поверхностью клеток в культуре; 2) в случае использования фолиевой кислоты эффективность интернализации биологически активных компонентов выше, чем для биотина, что может быть связано как с большим количеством фолатных рецепторов на поверхности клеток Нер G2, так и с большей константой связывания в сравнении с биотиновыми рецепторами.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60414X0021).

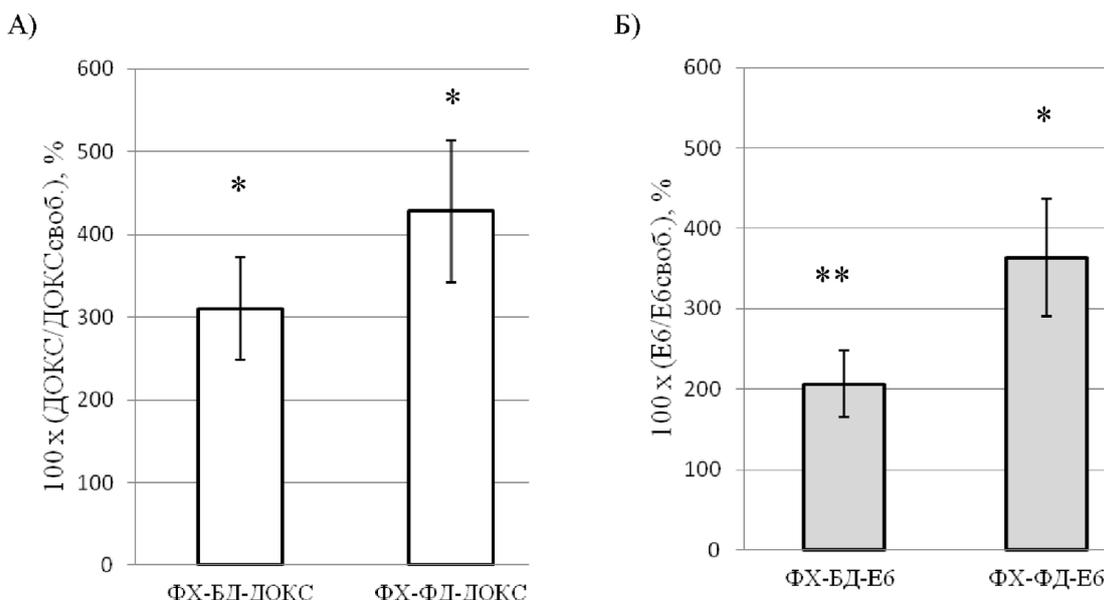


Рисунок 2. Интернализация доксорубина (А) и хлорина е6 (Б) после 30 минутной инкубации клеток Нер G2, введённых в инкубационную среду в составе лекарственных композиций ФХ-БД-ДОКС и ФХ-ФД-ДОКС, ФХ-БД-Е6 и ФХ-ФД-Е6 относительно включения соответствующих лекарств, введённых в инкубационную среду в свободном виде в %. Отличие между количеством прошедшего внутрь клетки лекарства в результате инкубации со свободной субстанцией и в составе фосфолипидной композиции с адресным конъюгатом: * - $p < 0,05$ и ** - $p < 0,1$.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bangham A.D., Horne R.W.* (1964) *J. Mol. Biol.*, **8**, 660-668.
2. *Bozzuto G., Molinari A.* (2015) *Int. J. Nanomed.*, **10**, 975-999.
3. *Akhtar M.J., Ahamed M., Alhadlaq H.A., Arokayan S.A., Kumar S.* (2014) *Clin Chim Acta*, **436**, 78-92.
4. *Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., Zalutsky M.R., Sobolev A.S.* (2014) *Curr. Pharm. Des.*, **21**, 1227-1238.
5. *Kim S., Kim D., Jung H.H., Lee I.H., Kim J.I., Suh J.Y., Jon S.* (2012) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 1890-1894.
6. *Cao J., Cui S., Du C., Tian J., Wan S., Qian Z., Gu Y., Chen W.R., Wang G.* (2013) *Cancer Res.*, **73**, 1362-1373.
7. *Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Игнатов Д.В., Дружилловская О.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М.* (2015) *Биомед. химия*, **61**, 219-230.
8. *Санжаков М.А., Игнатов Д.В., Прозоровский В.Н., Дружилловская О.С., Медведева Н.В., Ипатова О.М.* (2014) *Биомед. химия*, **60**, 713-716.
9. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Foarr A.L., Randall R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
10. *Bolhassani A., Khavari A., Bathaie S.Z.* (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **845**, 20-30.
11. *Kohlhaas S.L., Craxton A., Sun X.-M., Pinkoski M.J., Cohen G.M.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12831-12841.
12. *Shirazi M.F., Aronson N.N., Jr., Dean R.T.* (1982) *J. Cell Sci.*, **57**, 115-137.
13. *Lee R.J., Low P.S.* (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 3198-3204.

Поступила: 15. 03. 2016.
Принята к печати: 10. 05. 2016.

THE INCREASE IN RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS OF DRUGS IN THE COMPOSITION OF NANOPARTICLES WITH THE ADDRESS FRAGMENT

L.V. Kostryukova, M.A. Sanzhakov, D.V. Ignatov, V.N. Prozorovskiy, O.S. Druzhilovskaya, E.S. Kasatkina, N.V. Medvedeva, O.M. Ipatova

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121, Russia; tel.: +7(499)2469491, +7(495)7083807;
e-mail: nmedvedeva@ibms.msk.ru

It is known that disorders in the cell functioning of the organs/tissues is accompanied by increased expression of certain receptors. A modern approach to improve the specificity of the drug accumulation in the affected area is to construct the delivery nanosystems with the address fragments. Active tagged transport may help to reduce the dose of the drug, minimizing the impact on healthy cells and organs (reduced adverse events). This approach is particularly important in oncology because of the high toxicity of the drugs used. In this work we have obtained and characterized the pharmaceutical composition of doxorubicin and chlorine e6 into colloidal nanoparticles with synthesized previously targeted conjugates based on folic acid and biotin. On the cell culture Hep G2 it was shown an increase in the internalization of drugs when they were introduced in the incubation medium in the form of drug compositions with transport nanosystems and targeted fragments.

Key words: targeted delivery system, Hep G2, folic acid, biotin, intracellular internalization