

©Коллектив авторов

ГЛИКОКОНЬЮГАТЫ НА ОСНОВЕ ЛАКТОЗЫ СО СПЕЙСЕРАМИ РАЗЛИЧНОЙ ДЛИНЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТРАНСПОРТНЫХ СИСТЕМ К КЛЕТКАМ ПЕЧЕНИ

А.С. Носова^{1,2}, О.О. Колоскова^{1,2}, И.П. Шиловский¹, Ю.Л. Себякин², М.Р. Хаитов¹*

¹Государственный научный центр “Институт иммунологии”,
115478, Москва, Каширское шоссе, 24; тел.: +7(499)612-89-89; эл. почта: as.nosova@nrcii.ru

²Московский технологический университет (МИТХТ), Москва

Асиалогликопротеиновые рецепторы являются наиболее распространённым типом рецепторов на поверхности клеток печени и обладают специфичными участками связывания для гликопротеинов сыворотки крови. Это способствует созданию адресных липосомальных систем доставки лекарств, способных селективно доставлять содержимое в клетки печени. Модификация липосомальной поверхности производными углеводов приводит к увеличению эндоцитоза, что способствует селективному поглощению таких систем гепатоцитами. В данной работе были синтезированы неогликоконъюгаты на основе лактозы с остатком пальмитиновой кислоты в гидрофобном домене. Углеводсодержащие амфифилы использовали для модификации липосомальной поверхности. Исследования трансфекционной активности водных дисперсий, проведённые на специфической линии клеток HepG2 (гепатоциты), показали повышение эффективности по сравнению с немодифицированными липосомами, в то время как активность модифицированных и немодифицированных липосом в отношении неспецифической линии клеток 293Т была одинаковой. Это свидетельствует о потенциальной возможности использования новых неогликоконъюгатов для доставки нуклеиновых кислот адресно в клетки печени.

Ключевые слова: гликоконъюгаты, модификация липосом, направленный транспорт, гепатоциты

DOI: 10.18097/PBMC20176305467

ВВЕДЕНИЕ

Внедрение в фармацевтическую технологию направленных систем доставки позволило повысить эффективность лечения многих трудно излечиваемых заболеваний [1]. Направленная доставка улучшает биодоступность препарата в организме, снижает проявление нежелательных побочных эффектов и позволяет применять лекарственный препарат в меньших дозах. Особенно важно использование технологий направленной доставки лекарств в области генной терапии, зарекомендовавшей себя как достаточно эффективный инструмент медицины последнего десятилетия [2, 3]. Генная терапия требует избирательной и локальной стратегии лечения заболеваний, которая может быть обеспечена системами направленной доставки ДНК- или РНК-препаратов [4–6].

Одним из методов создания структур, обладающих направленным действием, является создание модифицированных липосомальных контейнеров [7]. Такие системы доставки приобретают активную тканевую и/или клеточную направленность, если в их структуру ввести специфичные лиганды, связывающиеся с определённым типом рецепторов на внешней мембране клеток органа- или ткани-мишени [2]. Многие рецепторы имеют гликопротеиновую или протеогликановую природу, что указывает на важность разработок лигандов на основе моно-, олиго- и полисахаридов.

Наноконтейнеры, содержащие синтетические лиганды на основе дендримеров и олигомеров галактозы, лактозы или N-ацетилгалактозы, являются

весьма многообещающими средствами направленной доставки к клеткам печени. Добавление спейсеров длиной 25–30 Å улучшает их способность проходить через плазматическую мембрану. Причём терминальный остаток углевода должен быть невосстанавливающим [10].

Целью данной работы являлась модификация липосомальной поверхности неогликоконъюгатами, оценка их адресных свойств и влияния длины спейсера на эффективность трансфекции (внутриклеточного транспорта нуклеиновых кислот).

МЕТОДЫ

Получение неогликоконъюгатов

В работе использовали химические реагенты “Sigma Aldrich” (США).

Согласно разработанной схеме синтеза (рис. 1) Gly-C₁₆H₃₃ (**2**) получали по реакции сплавления гексадецилового спирта и L-глицина (**1**) в присутствии *n*-толуолсульфокислоты. Для получения диглицин-производного проводили активацию карбоксильной группы N-трет-бутилкарбокси-глицина (**3a**) с последующим присоединением эфира L-глицина (**2**) и получали BocGlyGly-C₁₆H₃₃ (**4a**). Аналогичным образом получали BocGlyGlyGly-C₁₆H₃₃ (**4b**).

Для удаления защитных Boc-группировок использовали раствор безводной трифторуксусной кислоты с получением соединений (**5a,b**). В ¹H-ЯМР-спектре (**5a**) присутствовали сигналы протонов метильной концевой группы [δ, м.д.: 0,88 (3H, т)], сигналы протонов алкильных групп в составе

* - адресат для переписки

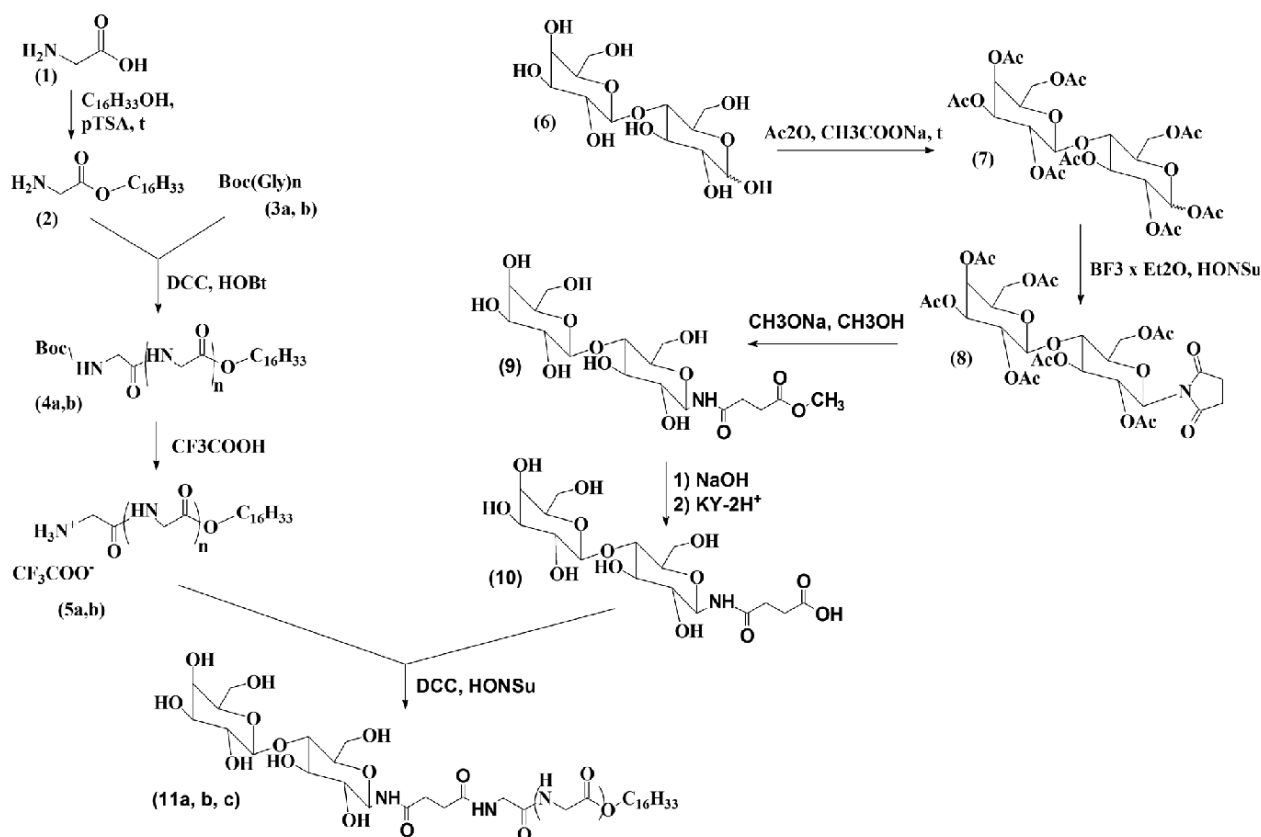


Рисунок 1. Схема синтеза гликоконъюгатов.

остатка гексадецилового спирта [δ , м.д.: 1,27 (14H, с), 4,14 (2H, т)], сигналы протонов алкильных групп в остатках глицинов [δ , м.д.: 3,48 (2H, с), 3,93 (2H, т)] и протонов при атомах азота [δ , м.д.: 6,08 (1H, т), 7,67 (2H, т)].

Октаацетат лактозы (7) получали обработкой D-лактозы (6) уксусным ангидридом, температура плавления полученного соединения соответствует литературным данным.

N-сукцинимидное производное октаацетата лактозы (8) получали реакцией гликозилирования в присутствии эфира трёхфтористого бора, целевое соединение выделяли методом колоночной хроматографии. В ^1H -ЯМР-спектре (8) присутствовали сигналы протонов ацетильных групп [δ , м.д.: 1,89–2,07 (21H, с)] в виде семи синглетов, характерный сигнал протонов N-сукцинимидного кольца [δ , м.д.: 2,28 (4H, с)]. Конфигурацию аномерного центра определяли, как β -аномер [δ , м.д.: 5,49 (1H, с, H-1, J1,2, 6,3 Гц)].

Раскрытие N-сукцинимидного цикла с образованием соединения (9) проводили под действием 0,1 М раствора метилата натрия в метаноле. Затем омылением метилового эфира сукцинимид лактозы с последующей ионообменной хроматографией получали соединение (10).

Конечные соединения (11a,b,c) получали реакцией этерификации между соединением (10) с активированной карбоксильной группой и алкильными производными L-глицина (2, 5a,b).

Подтверждение структур соединений

Спектры ^1H -ЯМР регистрировали для растворов веществ в дейтерохлороформе на импульсном ЯМР-спектрометре “Bruker WM-300” (Германия) с рабочей частотой 300 МГц, внутренний стандарт – гексаметилдисилоксан. ИК-спектры снимали на ИК-Фурье спектрометрах “Bruker EQUINOX 55” и “Bruker Alpha” (Германия). Температуры плавления определяли на приборе “Boetius”.

Получение липосомальных дисперсий

К катионному липотрипептиду OrnOrnGlu(C₁₆)₂ добавляли один из синтезированных неогликоконъюгатов в количестве 10% от липидного состава на этапе формирования тонкой липидной плёнки. Получали три вида липидной композиции. Каждый тип навески (2 г) растворяли в хлороформе. Затем растворитель отгоняли на вакуумном ротационном испарителе до образования тонкой липидной плёнки. Плёнку дополнительно выдерживали на вакууме в течение 3 ч. Затем добавляли 1 мл дистиллированной воды и оставляли колбу для гидратации плёнки на 1 ч при комнатной температуре. После встряхивания и перемешивания полученную дисперсию озвучивали на ультразвуковой бане (3×15 мин) при 65°C. Для гомогенизации частиц и стерилизации дисперсии её пропускали через миниэкструдер с поликарбонатными фильтрами (диаметр пор – 100 нм).

Трансфекция плазмидной ДНК

Накануне трансфекции клетки высаживали в планшет в количестве 7×10^4 клеток на лунку 48-луночного планшета (Nunc) в 300 мкл полной питательной среды DMEM (содержит 10% ЭТС, 300 мг/л L-глутамин, 25 мМ HEPES, 50 мкг/мл Гентамицина) и инкубировали сутки при 37°C в CO₂-инкубаторе до достижения 75% конfluентности. Дисперсию трансфекционного агента в четырёх концентрациях общим объёмом 80 мкл, состоящего из 0,2 мкг плазмиды (pGFP или pGL3) и липосомальной дисперсии соответствующей концентрации готовили в бессывороточной среде OPTIMEM. В качестве положительного контроля использовали коммерческий трансфекционный агент Lipofectamine 2000. В качестве отрицательного контроля использовали “голую” плазмиду. Приготовленные смеси выдерживали 30 мин при комнатной температуре и вносили в лунки с монослоем клеток. Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение суток и затем определяли люциферазную активность методом люциферазного теста с использованием коммерческих реагентов (“Promega”, США) или считали количество трансфицированных клеток методом флуоресцентной микроскопии.

Люциферазный тест

Тест проводился с использованием коммерческого набора “Luciferase Assay System” (“Promega”) согласно рекомендациям производителя. Для этого удаляли ростовую среду из лунок, затем добавляли 70 мкл лизирующего буфера Glo lysis buffer, 1× (США). Клетки выдерживали 15 мин при 37°C в CO₂-инкубаторе для достижения полного лизиса. Затем соскабливали их со дна ячеек и переносили клеточную суспензию в пробирки типа erpendorf. Для осаждения клеточного дебриса полученный лизат центрифугировали 3 мин на 10000 оборотов. Отбирали по 50 мкл супернатанта и добавляли люциферазный субстрат в соотношении 1:1. Эффективность трансфекции оценивали по уровню люминесценции на Glomax 20/20 luminometr.

Анализ цитотоксичности (МТТ тест)

Определение цитотоксичности проводили, используя известный метод, основанный на восстановлении красителя метилтетразолиевого синего (МТТ) под действием восстановленной формы НАД-Н в митохондриях до нерастворимого в воде формазана. МТТ имеет жёлтую окраску, а формазан окрашен в фиолетово-синий цвет. Число живых клеток пропорционально количеству восстановленного формазана, которое можно определить спектрофотометрически.

Накануне эксперимента клетки высаживали в 96-луночный планшет в количестве 2×10^4 клеток на лунку в полной питательной среде DMEM и инкубировали сутки при 37°C в CO₂-инкубаторе до 75% конfluентности.

В лунках создавали различные концентрации липосомальных дисперсий методом последовательного разведения, инкубировали 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Затем в каждую лунку добавляли по 25 мкл МТТ в фосфатно-солевом буфере с концентрацией 4 мг/мл и помещали в CO₂-инкубатор. Через 4 ч добавляли 50 мкл SDS (20% SDS в воде с 0,02 N H₂SO₄). Инкубировали сутки. Определяли разницу оптической плотности раствора при 570 и 650 нм на BIO RAD I Mark microplate reader в программе “Земфира”. Количество живых клеток рассчитывали, как отношение оптической плотности в лунке с заданной концентрацией липосомальной дисперсии к оптической плотности в контроле:

$$\text{количество живых клеток (\%)} = (A_{\text{дисперсия}}/A_{\text{контроль}}) \times 100\%.$$

Каждое значение получали усреднением трёх параллельных измерений.

Строили график полученных значений от логарифма концентрации, определяли IC₅₀ (находили решение уравнения линии тренда 6 порядка).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липосомы привлекаются для доставки в клетки лекарственных, диагностических веществ и генетического материала, не способных самостоятельно преодолевать клеточную мембрану. Отличительными особенностями таких систем являются неиммуногенность, биodeградируемость и биосовместимость [8, 11, 12]. Для увеличения эффективности действия липосомальных препаратов в экспериментах *in vivo* используется активное нацеливание, которое достигается присоединением к поверхности липосом “молекулярного адреса” – маркера, для связывания с которым клетка-мишень имеет соответствующие рецепторы.

Известно, что клетки печени содержат на своей поверхности асиалогликопротеиновые рецепторы и галектины, лигандами для которых служат галактозо-содержащие углеводы [10, 13, 14]. Поэтому для создания адресной композиции в данной работе липосомы модифицировали нейтральными углеводами, содержащими терминальный остаток лактозы.

Было синтезировано три производных лактозы с различной длиной спейсера между гидрофобным и гидрофильным доменами амфифила (рис. 1). В качестве спейсера использовали моно-, ди- и три-глициновые остатки. Присоединение спейсера к гидрофобному домену проводили методом сплавления. Для формирования углеводной полярной части сначала проводили реакцию ацилирования лактозы с последующей модификацией аномерного центра N-гидроксисукцинимидом. Полученные соединения встраивали в липосомы в качестве лигандов направленной доставки в количестве 10% от липидного состава. Было установлено, что количество лигандов на поверхности липосомы имеет гораздо большее значение, чем их степень разветвлённости [10].

Для оценки адресной функции липосом определяли эффективность трансфекции на модельной неспецифичной линии клеток 293Т (эмбриональная почка человека) и специфичной линии клеток печени человека НерG2 (рис. 2) с помощью люциферазного теста. Было установлено, что гликоконъюгаты в составе липосом увеличивают эффективность трансфекции на специфичной линии клеток печени НерG2 по сравнению с немодифицированными липосомами почти в четыре раза.

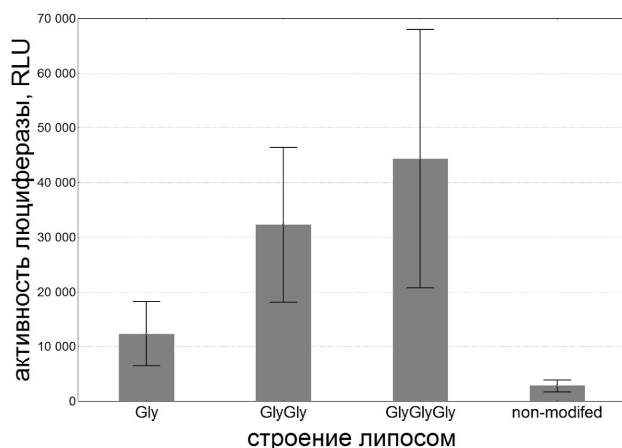


Рисунок 2. Активность люциферазы в культуре клеток Нер G2, трансфицированных с помощью липоплексов, содержащих 0,2 мкг плазмиды рGL3, кодирующей ген люциферазы. n=4.

Расстояние между углеводным остатком и поверхностью липосомы является важным параметром для успешного взаимодействия с лектинами. Результаты исследований показывают, что достаточно спейсера с длиной в две единицы этиленоксида, чтобы углевод на поверхности бислоя смог взаимодействовать с клеточными рецепторами. Наилучший результат был достигнут с использованием гликоконъюгатов со спейсерами длиной 6 и 8 единиц, именно такое расстояние требуется для успешного эндоцитоза клетками организма. Таким образом, наличие одного спейсерного звена недостаточно для эффективного рецептор-опосредованного захвата [15].

Известно, что отсутствие гидрофильного спейсера не даёт остаткам сахаров активно связываться с рецепторами [16], хотя избыточная длина спейсера также не позволяет им взаимодействовать [17]. Для взаимодействия с лектинами производные углеводов должны отступать от поверхности липидного бислоя в водную фазу. Производное галактозы, имеющее триглицидное производное в качестве спейсера, является многообещающим соединением для модификации поверхности липосом. Длина данного спейсера примерно равна длине двух углеводных остатков. Лектин, способный к распознаванию галактозы, присутствует в клетках печени, поэтому модифицированные липосомы могут послужить отличным носителем терапевтических препаратов. Липосомы, с галактозными остатками, отделенными от поверхности бислоя длинными

гибкими спейсерами (например, ПЭГ10), напротив, практически полностью захватываются из кровотока клетками Купфера, макрофагами печени [16]. Слишком длинные спейсеры препятствуют взаимодействию галактозы и рецепторов клеток. Однако, в случае, если остатки галактозы располагались на отдалении по отношению к друг другу, то рецепторное узнавание гепатоцитами происходит эффективнее. Кроме того, более короткие спейсеры способствуют захвату липосом именно гепатоцитами, а не макрофагами.

В данной работе наблюдалось увеличение трансфекционной активности модифицированных липосом при возрастании длины спейсера: каждое звено глицина повышало эффективность трансфекции в среднем на 50% (рис. 2). В то же время эффективность трансфекции на неспецифичной линии клеток 293Т не изменилась при введении гликоконъюгатов в структуру липосом.

Для сравнения токсичности липосом модифицированных и немодифицированных гликоконъюгатом проводился МТТ-тест, в ходе которого было установлено, что введение производных лактозы в состав липосом не приводит к увеличению цитотоксичности (таблица).

Таблица. IC₅₀ для различных липосомальных композиций

Компоненты липосом	Линия клеток 293Т
OrnOrnGlu(C ₁₆) ₂	347,6±38,3 мкг/мл
OrnOrnGlu(C ₁₆) ₂ + LacGlyC ₁₆	348,2±41,4 мкг/мл
OrnOrnGlu(C ₁₆) ₂ + LacGlyGlyC ₁₆	351,6±39,9 мкг/мл
OrnOrnGlu(C ₁₆) ₂ + LacGlyGlyGlyC ₁₆	353,2±42,6 мкг/мл

Таким образом, введение неогликоконъюгатов в состав липоплекса повышает эффективность трансфекции на специфичных клетках печени, что говорит о наличии адресной функции у модифицированных липосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Разработана схема получения и синтезированы неогликоконъюгаты на основе лактозы со спейсерами из цепочек глицина различной длины, которые успешно использованы для модификации липосомальной поверхности

Исследовано влияние углеводной модификации и длины спейсера на эффективность трансфекции плазмидной ДНК. Подтверждено, что модифицированные липосомы гораздо эффективнее связываются с рецепторами, если лиганды вынесены от поверхности бислоя при помощи спейсера. При этом эффективность возрастает с ростом длины спейсера.

Показано, что введение производных лактозы в состав липосомального комплекса обеспечивает повышение эффективности адресной доставки в условиях *in vitro*.

Полученные данные позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших исследований модифицированных липоплексов для проведения полного объема доклинических испытаний с целью разработки липосомальных лекарственных препаратов для терапии заболеваний печени.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-01080 и стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов (СП-998.2016.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Tiwari G., Tiwari R., Sriwastawa B., Bhati L., Pandey S., Pandey P., Bannerjee S.K. (2012) *Int. J. Pharm. Investig.*, **2**(1), 2-11.
2. Хаитов М.Р., Литвин Л.С., Шиловский И.П., Баикатова Ю.Н., Файзулов Е.Б., Зверев В.В. (2010) *Иммунология*, **31**(2), 69-76.
3. Шиловский И.П., Сундукова М.С., Гайсина А.Р., Ласкин А.А., Смирнов В.В., Бабахин А.А., Хаитов М.Р. (2016) *Экспер. клин. фармакол.*, **79**(4), 35-44.
4. Wooddell C.I., Rozema D.B., Hossbach M., John M., Hamilton H.L., Chu Q., Hegge J.O., Klein J.J., Wakefield D.H., Oropeza C.E. et al. (2013) *Molecular Ther.*, **219**(5), 973-985.
5. Duan L., Yan Y., Liu J., Wang B., Li P., Hu Q., Chen W. (2016) *Scientific Reports*, **6**(4), 1-12.
6. Hannon G.J., Rossi J.J. (2004) *Nature*, **431**(9), 371-378.
7. Budanova U.A., Koloskova O.O., Sebyakin Y.L. (2010) *Mendelev Communications*, **20**(6), 326-328.
8. Koloskova O.O., Nikonova A.A., Budanova U.A., Shilovskiy I.P., Kofidi I.A., Ivanov A.V., Smirnova O.A., Zverev V.V., Sebyakin Y.L., Andreev S.M., Khaitov M.R. (2016) *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut.*, **102**, 159-167.
9. Budanova U.A., Shchelik I.S., Koloskova O.O., Sebyakin Y.L. (2016) *Mendelev Communications*, **26**(3), 205-206.
10. D'Souza A.A., Devarajan P.V. (2015) *J. Controlled Release*, **203**, 126-139.
11. Koloskova O.O., Budanova U.A., Sebyakin Y.L. (2012) *Mendelev Communications*, **22**(3), 78-79.
12. Koloskova O.O., Budanova U.A., Sumina A.M., Sarychev G.A., Sebyakin Y.L. (2014) *Mendelev Communications*, **24**, 262-263.
13. Witzigmann D., Quagliata L., Schenk S.H., Quintavalle C., Terracciano L.M., Huwiler J. (2015) *Hepatology research: the official journal of the Japan Society of Hepatology*, **46**, 686-696.
14. Ashwell G., Harford J. (1982) *Ann. Rev. Biochem.*, **51**(2), 531-554.
15. Engel A., Chatterjee S.K., Al-Arifi A., Riemann D., Langner J., Nuhn P. (2003) *Pharmaceut. Res.*, **20**(1), 51-57.
16. Yoshioka H., Ohmura T., Hasegawa M., Hirota S., Makino M., Kamiya M. (1993) *J. Pharmaceut. Sci.*, **82**(3), 273-275.
17. Shimada K., Kamps J.A.A.M., Regts J., Ikeda K., Shiozawa T., Hirota S., Scherphof G.L. (1997) *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1326**(2), 329-341.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 12. 09. 2017.

LACTOSE-BASED GLYCOCONJUGATES WITH VARIABLE SPACERS FOR DESIGN OF LIVER-TARGETED LIPOSOMES

A.S. Nosova^{1,2}, O.O. Koloskova^{1,2}, I.P. Shilovskiy¹, Yu.L. Sebyakin², M.R. Khaitov¹

¹INRC Institute of Immunology,
24 Kashirskoye, Moscow, 115478 Russia; tel.: +7(499)612-89-89; e-mail: as.nosova@nrcii.ru
²Moscow Technological University (campus MITH), Moscow, Russia

Asialoglycoprotein receptors are highly abundant on the hepatocyte surface and have specific binding sites for blood serum glycoproteins. Such discovery resulted in development of liver-targeted drug delivery systems because modification of the liposomal surface by carbohydrate derivatives results in an increase of endocytosis, which facilitates selective uptake of such systems by hepatocytes. In this study we have synthesized novel lactose derivatives containing a palmitic hydrophobic domain. They were used for modification of the liposome surface. Transfection activity of modified liposomes was analyzed on the HepG2 cell line (hepatocytes) and showed an increase in the transfection efficiency as compared to the non-modified liposomes. At the same time transfection activities of modified and non-modified liposomes were similar in the case of a non-hepatocyte cell line (293T). The novel lactose-based glycoconjugates may be a promising tool for developing efficient vectors for delivery of nucleic acids to hepatocytes.

Key words: glycoconjugates, liposome modification, targeted transport, hepatocytes