

Д. А. Безруков*аспирант,***Т. Г. Баландин****младший научный сотрудник,***С. М. Деев****заведующий лабораторией,***В. В. Попенко*****ведущий научный сотрудник,***А. П. Каплун***профессор,**кафедра Биотехнологии**МИТХТ им. М.В. Ломоносова***лаборатория молекулярной иммунологии,**Институт биоорганической химии**им. Ю. А. Овчинникова и М. М. Шемякина РАН****Институт молекулярной биологии РАН***ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К
КОНСТРУИРОВАНИЮ СЛОЖНЫХ
ЛИПОСОМНЫХ СИСТЕМ
ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
ПРЕПАРАТОВ**

УДК 547.9:612.397

Рассматриваются проблемы, возникающие при конструировании сложных нацеленных липосомных систем доставки с контролируемым высвобождением. На примере получения термочувствительных, стерически стабилизированных, нацеленных с помощью барстара, активно загруженных доксорубицином липосом предлагается возможный путь их решения.

Список сокращений: DPPC – дипальмитоилфосфатидилхолин; DSPC – дистеароилфосфатидилхолин; DSPE – дистеароилфосфатидилэтаноламин; Mal – малеимид; PEG – полиэтиленгликоль.

Несмотря на то, что липосомы исследуется как средство доставки лекарств уже 40 лет, и на фармацевтическом рынке уже более десятка липосомных лекарственных препаратов, проблем, связанных с их получением, не уменьшается. Это связано в первую очередь с тем, что современные липосомные препараты представляют собой довольно сложные конструкции. Так как лекарственные препараты, как правило, не имеют сродства к мишени, например, к клеткам опухолей, первоначально исследовались конъюгаты, в которых молекула эффектора была присоединена непосредственно к нацеливающему лиганду. Для увеличения числа молекул лекарственного вещества,

доставляемого в клетку-мишень, в качестве средства доставки используются липосомы. Но эффективность липосомных препаратов часто намного ниже, чем можно было ожидать, так как значительная часть введенных липосом захватывается макрофагами. Для устранения этого недостатка были разработаны липосомы с увеличенным временем циркуляции (за счет т.н. стерической стабилизации).

Гидрофильная оболочка подобных липосом (наиболее часто используется полиэтиленгликоль) ограничивает их распознавание и захват клетками ретикуло-эндотелиальной системы, что приводит к аккумуляции липосом в опухолевой ткани за счет эффекта пассивного нацеливания.

Важно, чтобы лекарственное вещество надежно удерживалось внутри липосом и вместе с тем выходило (желательно с регулируемой скоростью) из липосом при достижении ткани или органа-мишени. Для этой цели используют липосомы с контролируемым высвобождением, к примеру, термо- и pH-чувствительные липосомы, имеющие достаточно жесткую мембрану при нормальных (физиологических) условиях, но при повышении температуры (в случае термочувствительных липосом) или

понижении pH среды (для pH-чувствительных), свойственных опухолевым тканям, проницаемость мембраны таких липосом резко увеличивается. Термочувствительные липосомы состоят, как правило, из таких липидов как DPPC, DSPC и др. [1, 2], в состав pH-чувствительных липосом вводят липиды, форма молекул которых меняется при изменении pH [3]. Особенно интересны такие липосомы в случае активного нацеливания на опухолевые клетки с неравномерным распределением мишеней. Клетки, не экспрессирующие или экспрессирующие недостаточное количество маркеров-мишеней, могут быть уничтожены в результате высвобождения эффектора из липосом, связавшихся с поверхностью соседних клеток.

Активное нацеливание состоит в присоединении какого-либо специфично нацеливающего начала к поверхности липосом, что усиливает взаимодействие с клетками и тканями, через связывание с соответствующими маркерами, присутствующими на поверхности этих клеток. Существуют различные стратегии для присоединения подобного молекулярного адреса к поверхности липосом. Молекула может быть присоединена к гидрофобному якорю как непосредственно, так и через спейсер. Строение и длина спейсера очень важны, и выбираются таким образом, чтобы исключить препятствия к взаимодействию с маркером со стороны полимерных цепей, осуществляющих стерическую стабилизацию липосомы.

Широкие возможности представляют конструкции, в которых к ПЭГ-цепи присоединяют молекулу, способную образовывать прочный комплекс с соответствующим партнером (авидин-биотин [4], барстар-барназа [5]). Такие липосомы являются универсальными конструкциями, к которым можно присоединять различные молекулярные адреса, зонды и т. п.

Помимо методов увеличения селективности и накопления липосом в

тканях-мишенях, параллельно развивались методы получения липосом с увеличенной загрузкой лекарственного вещества. Один из них – активная загрузка, при которой вещество загружается в уже сформированные липосомы под воздействием градиента pH [6] или сульфата аммония [7]. При этом процент включившегося вещества может достигать 99% и более от исходного количества при соотношении лекарственное вещество/липид 0.1–0.3, что недостижимо в большинстве случаев для методов пассивной загрузки. Но, хотя активная загрузка и увеличивает количество попадающих в липосому молекул лекарства, нередко этот метод (что подтверждается и нашими экспериментами) приводит к ухудшению последующего высвобождения, например, в случае активной загрузки доксорубицина с использованием градиента сульфата аммония. Поэтому представляется целесообразным использовать активную загрузку при создании липосом, рассчитанных на интернализацию в клетки-мишени.

Таким образом, можно представить себе «идеальную», или близкую к таковой, липосомную конструкцию, которая включает в себя собственно липосому, максимально загруженную лекарственным веществом, к поверхности которой присоединены: полиэтиленгликолевые цепи для увеличения времени циркуляции, причем на концах некоторых находятся молекулы «молекулярного адреса» для избирательного связывания с клеткой-мишенью, а для дополнительной эффективности в мембрану может быть инкорпорирован белок слияния, обеспечивающий высвобождение содержимого липосомы в цитозоль. Желательно также, чтобы полиэтиленгликолевые цепи, предохраняющие липосому от опсонизации в крови, не мешали бы ее контакту с мембраной клетки-мишени. Одним из решений этой проблемы является

присоединение молекул полиэтиленгликоля к молекуле фосфатидилэтаноламина через легко гидролизруемую связь. Сочетание перечисленных особенностей данной конструкции приводит к тому, что получение липосом становится нетривиальной задачей. Более того, дополнительные ограничения накладывает выбранный способ загрузки липосом.

К примеру, при попытке получения термочувствительных, нацеленных, активно загруженных липосом может возникать сразу целый ряд проблем. В нашей работе при конструировании липосомной системы доставки к полиэтиленгликолевому спейсеру мы присоединяли белок барстар (~10 кДа), ингибитор рибонуклеазы барназы, образующий с ней комплекс с константой связывания порядка 10^{-14} М. Применение данного подхода дает возможность создать систему доставки с высокой степенью универсальности, т. к. позволяет к уже готовой липосомной дисперсии добавлять различные полученные генноинженерными методами белковые "молекулярные адреса", состоящие из барназы, обеспечивающей их связывание с модифицированной липосомой, и, собственно, подходящей нацеливающей части – фрагмента антитела, рецепторного лиганда, метки и т. п.

Однако высокая лабильность барстара в кислых условиях раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (рН 5.5), используемого для создания градиента, обеспечивающего активную загрузку, не позволяет вводить белково-липидный конъюгат на этой стадии получения липосом. Кроме того, и на следующей стадии активной загрузки его введение представляется нецелесообразным. Дело в том, что основным компонентом термочувствительных липосом является DPPC, температура фазового перехода которого составляет 41.5°C. Активная

загрузка возможна при температуре фазового перехода и выше, но нагревание может приводить к потере активности белка.

Для решения возникших проблем нами была выбрана следующая схема. Первоначально экструзией получают липосомы, содержащие сульфат аммония. После отделения невключившейся соли, в инертной атмосфере при нагревании к липосомной дисперсии добавляется раствор доксорубина и раствор, содержащий мицеллы PEG(2000)-DSPE и малеимидного производного PEG(3400)-DSPE, таким образом, одновременно производится активная загрузка действующего вещества и инкорпорация в бислой липосом липидов с полиэтиленгликолевыми цепочками (т. н. метод "post-insertion"), осуществляющих стерическую стабилизацию и являющихся спейсером для нацеливающего белка. Данный метод имеет еще одно преимущество: если белково-липидный конъюгат вводится на стадии формирования липосом, значительная его часть (до 50%) может встроиться в бислой с внутренней стороны липосомы, тем самым делая бесполезными соответствующие молекулы ценного белка, тогда как при выбранном нами подходе белок присоединяется к соответствующим спейсерам только на следующей стадии, практически полностью оказываясь на внешней поверхности липосомного бислоя.

Далее уже при комнатной температуре в соответствующем буфере происходит присоединение SH-группы белка к малеимидному производному в соответствии с методикой [8].

Электронные микрофотографии (рис. 1) показывают значительное количество связанных с липосомой молекул барстара, хотя их число и меньше расчетного, что объясняется, по-видимому, не 100% выходом реакции конъюгации.

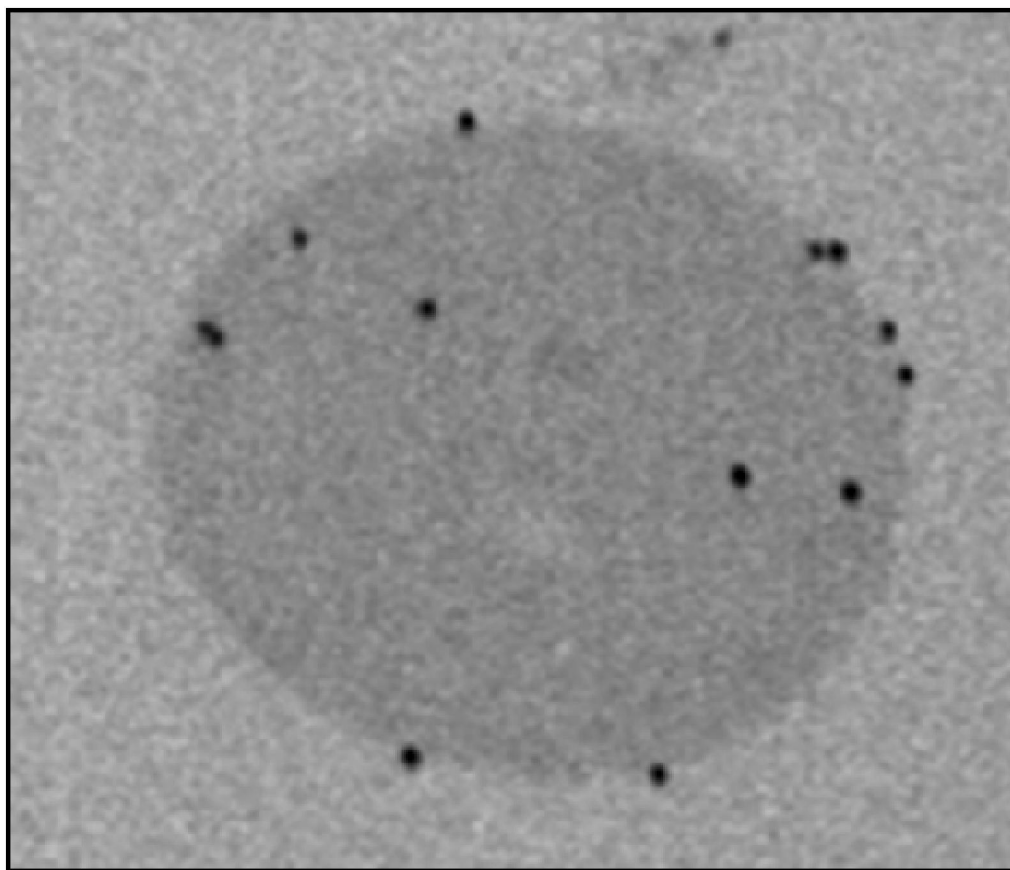


Рис. 1. Электронная микрофотография липосомы с присоединенными мишенями (в качестве мишеней – частицы коллоидного золота, связанные с барназой).

Таким образом, разработанная последовательность операций позволяет получать термочувствительные стерически стабилизированные липосомы, способные присоединяться к субстанциям, несущим барназу.

Материалы и методы

В круглодонную колбу объемом 25 мл поместили 32.5 мг дипальмитоил-фосфатидилхолина (спиртовой раствор) и 7.7 мг холестерина (хлороформный раствор), а также 4.6 мг PEG(2000)-DSPE (хлороформный раствор). Растворители удаляли на роторном испарителе, высушивали в вакууме, после чего в колбу добавляли 1 мл профильтрованного через фильтр 100 нм 250 мМ раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (pH 5.5). Содержимое колбы пятикратно замораживали-оттаивали.

Полученную липосомную дисперсию 19 раз продавливали в нагретом до 60°C экструдере LiposoFast (Avestin, Inc.) через ядерную мембрану с диаметром пор 200

нм и на колонке Sephadex G-25 отделяли от невключившегося сульфата аммония. Элюировали буферным раствором (10 мМ HEPES-Na, 135 мМ NaCl, pH 7.4), наличие липосом в отбираемых по 0.5 мл фракциях определяли спектрофотометрически. В круглодонную колбу объемом 25 мл помещали 1.4 мг Mal-PEG(3400)-DSPE и 3.7 мг PEG(2000)-DSPE в виде хлороформного раствора (отношение Mal-PEG(3400)-DSPE/PEG(2000)-DSPE 1/4 по молям). Растворитель удаляли на роторном испарителе и высушивали липиды в вакууме. Сухие липидные пленки, содержащие Mal-PEG(3400)-DSPE гидратировали 1 мл указанного деоксигенированного буфера под аргоном при осторожном перемешивании и нагревании до 60°C. Полученный раствор мицелл смешивали с липосомами, одновременно в липосомную дисперсию вносили 3 мг доксорубина (деоксигенированный буфер), после чего смесь осторожно

перемешивали под аргоном при температуре 60°C в течение 1 часа.

К липосомам в деоксигенированном буфере добавляли 0.8 мг белка. Реакцию проводили в соответствии с методикой [8]. После добавления белка pH доводили до 7.3-7.4 и оставляли на ночь при комнатной температуре под аргоном при осторожном перемешивании. Свободные малеимидные группы блокировали реакцией с избытком β-меркаптоэтанола в течение 30 мин при комнатной температуре.

Невключившийся в липосомы доксорубин отделяли гель-фильтрацией на колонке Sephadex G-25. В качестве элюента использовали физраствор. Профиль элюции липосом с доксорубином контролировали спектрофотометрически. Липосомы с молекулярным адресом собирали в свободном объеме колонки. Количество доксорубина определяли после разрушения аликвоты липосомной дисперсии метанолом по поглощению на 492 нм (эффективность включения доксорубина более 98%).

ЛИТЕРАТУРА:

1. J. Wells, A. Sen, S.W. Hui. Localized delivery to CT-26 tumors in mice using thermosensitive liposomes// *Int. J. Pharm.*, 2003, V. 261, P. 105-114
2. M. H. Gaber, K. Hong, S. K. Huang, D. Papahadjopoulos. Thermosensitive Sterically Stabilized Liposomes: Formulation and in vitro Studies on Mechanism of Doxorubicin Release by Bovine Serum and Human Plasma// *Pharm. Res.*, 1995, V. 12, No. 10, P. 1407-1416.
3. J. M. Kim, D. H. Thompson. Acid and Oxidatively Labile Vinyl Ether Surfactants: Synthesis and Drug Delivery Applications// Marcel Dekker, New York, Basel, 2001, P. 145-154.
4. T.M. Allen, C. B. Hansen, D. D. Stuart, Targeted sterically stabilized liposomal drug delivery// P. Lasic (Ed.), *Medical Applications of Liposomes*, Elsevier, Amsterdam, 1998, pp. 297– 323.
5. S.M. Deyev, R. Waibel, E. N. Lebedenko, A. P. Schubiger, A. Pluckthun, Design of multivalent complexes using the barnase-barstar module// *Nature Biotechnology*, 2003, V. 21, No 12, P. 1486-1492.
6. N.D. Santos, K. A. Cox, C. A. Mc Kenzie, F. van Baarda, R. G. Gallagher, G. Karlsson, K. Edvards, L. D. Mayer, C. Allen, M. B. Bally. pH gradient loading of anthracyclines into cholesterol-free liposomes: enhancing drug loading rates through use of ethanol// *Biochem. Biophys. Acta*, 2004, V. 1661, P. 47-60
7. G. Haran, R. Cohen, L.K. Bar, Y. Barenholz. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposome produce efficient and stable entrapment of amphipatic weak basis// *Biochem. Biophys. Acta*, 1993, V. 1151, P. 201-215
8. T.P. Derksen, G. L. Scherphof, An improved method for covalent coupling of proteins to liposomes// *BBA*, 1985, V. 814, P. 151-155.