

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2019-14-5-7-20>

УДК 547.918



Структурные особенности синтетических гликоконъюгатов и эффективность их взаимодействия с гликопротеиновыми рецепторами на поверхности гепатоцитов

А.С. Носова[@], У.А. Буданова, Ю.Л. Себякин

МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Москва 119571, Россия

[@]Автор для переписки, e-mail: c-221@yandex.ru

Цели. Последние несколько лет исследования в области медицинской химии уделяют большое внимание созданию молекул, направленно воздействующих на конкретные системы организма человека, органы и ткани, что помогает снизить общее токсическое воздействие препаратов на их основе, уменьшить степень проявления побочных эффектов, а самое главное – многократно усилить их терапевтический эффект. Это может быть достигнуто при помощи специфического взаимодействия подобных веществ с активными центрами клеточных рецепторов. Например, класс гликопротеиновых рецепторов, располагающихся на поверхности клеток нервной ткани и паренхимы печени, селективно связывает различные гликопротеины и гликозиды, способствуя их проникновению внутрь клеток. В обзоре рассмотрено влияние таких особенностей структуры лигандов, как природа и длина связующего звена (спейсера) между углеводной и неуглеводной частями молекулы, количество углеводных остатков в составе одной молекулы, а также ряда других, на эффективность проникновения синтетических гликоконъюгатов в клетки печени.

Методы. В обзоре проанализировано 75 публикаций и обобщены результаты исследований, в которых с помощью *in vitro* и *in vivo* экспериментов устанавливается, какая структура искусственно синтезированных производных углеводов окажется наиболее оптимальной для направленной доставки лекарственных средств в клетки печени.

Результаты. На поверхности гепатоцитов (клеток печени) в большом количестве представлен асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R), который почти не встречается на других типах клеток, что делает его идеальным рецептором-мишенью для направленного лечения заболеваний печени, в том числе таких трудно излечимых социально значимых заболеваний, как гепатоцеллюлярная карцинома и гепатит С. Разработан ряд разнообразных лигандов и систем направленной доставки к ASGP-R. Такие молекулы обязательно имеют в составе производные моно- и дисахаридов, чаще всего применяются D-глюкоза, D-галактоза, D-лактоза и N-ацетилглюкозамины. В обзоре приводятся примеры химических структур углеводсодержащих лигандов.

Заключение. Гликолипиды на основе D-углеводов в составе липосом обеспечивают их проникновение в клетки печени по механизму рецептор-опосредованного клатрин-зависимого эндоцитоза, который активируется при контакте углеводсодержащей части лиганда с активным центром ASGP-R. Показано, что для этого можно использовать как моновалентные производные углеводов, так и поливалентные гликоконъюгаты. Варьируя структуру лиганда и количество добавляемых к липосоме модификаций, можно достичь наибольшего терапевтического эффекта. Большое влияние на аффинность и клеточный ответ оказывают расстояние от поверхности липосомы до углеводного остатка (длина спейсера) и гидрофильно-липофильный баланс молекулы лиганда.

Ключевые слова: гликоконъюгаты, асиалогликопротеиновый рецептор, рецептор-опосредованный эндоцитоз, направленная доставка, клетки печени.

Для цитирования: Носова А.С., Буданова У.А., Себякин Ю.Л. Структурные особенности синтетических гликоконъюгатов и эффективность их взаимодействия с гликопротеиновыми рецепторами на поверхности гепатоцитов. *Тонкие химические технологии.* 2019;14(5):7-20. 7–20. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2019-14-5-7-20>

Structural features of synthetic glycoconjugates and efficiency of their interaction with glycoprotein receptors on the surface of hepatocytes

Anastasiya S. Nosova[@], Ulyana A. Budanova, Yury L. Sebyakin

MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow 119571, Russia

[@]Corresponding author, e-mail: c-221@yandex.ru

Objectives. Over the last few years, medicinal chemistry research has been focusing on the creation of molecules that can target particular body systems, organs and tissues, thus abating systemic toxicity and side effects, and, most of all, boosting therapeutic potential. This goal can be achieved through the specific interaction of such drugs with active sites of cellular receptors. For example, glycoprotein receptors that can be found on cellular surfaces in neural tissues and liver parenchyma, selectively bind various glycoproteins and glycosides, facilitating their penetration into cells. This review describes how certain parameters of ligand structure (the nature and length of the spacer between carbohydrate and non-carbohydrate fragments of the molecule, number of carbohydrate residues per molecule, etc.) influence the penetration efficiency of synthetic glycoconjugates into liver cells.

Methods. This review article summarizes 75 research papers and discusses data from *in vitro* and *in vivo* experiments showing which structures of synthetic carbohydrate derivatives are optimal for targeted drug delivery into liver cells.

Results. The surface of liver cells (hepatocytes) contains a significant number of asialoglycoprotein receptors (ASGP-R) that are almost never found elsewhere. This makes ASGP-R an ideal target for the directed treatment of liver diseases, including such difficult, socially important conditions as hepatocellular carcinoma and Hepatitis C. A number of various ligands and targeted (to ASGP-R) delivery systems have been designed. Such molecules always contain derivatives of mono- and disaccharides, most commonly D-glucose, D-galactose, D-lactose and N-acetylglucosamines. This review contains the chemical structures of carbohydrate-based ligands.

Conclusions. Glycolipids based on D-carbohydrates, when in liposomes, facilitate penetration into liver cells by a receptor-mediated, clathrin-dependent endocytosis mechanism that is activated upon contact of the carbohydrate-containing ligand fragment with the active site of ASGP-R. It can be addressed by the use of monovalent derivatives of carbohydrates as well as polyvalent glycoconjugates. Alterations in the ligand structure and the number of liposomal modifications can boost the therapeutic effect. The distance between the liposomal surface and the carbohydrate residue (spacer length), as well as the hydrophilic-lipophilic balance of the ligand molecule, have a great effect on the affinity and cellular response.

Keywords: glycoconjugates, asialoglycoprotein receptor, receptor-mediated endocytosis, targeted delivery, liver cells.

For citation: Nosova A.S., Budanova U.A., Sebyakin Yu.L. Structural features of synthetic glycoconjugates and efficiency of their interaction with glycoprotein receptors on the surface of hepatocytes. *Tonkie Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2019;14(5):7-20 (in Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2019-14-5-7-20>

Развитие подходов современной фармацевтики при разработке и создании лекарств в ближайшем будущем способно привести к созданию принципиально новых лекарственных препаратов, которые будут обладать хорошей биодоступностью и биосовместимостью, высокой эффективностью и незначительным проявлением токсических эффектов. Одним из решений такой сложной и многогранной задачи является получение наноразмерных частиц, несущих в себе небольшие эффективные дозы лекарственного вещества. Разнообразие наноразмерных систем доставки позволяет создавать терапевтические комплексы с требуемыми характеристиками. Ряд *in vitro* и *in vivo* исследований различных систем доставки позволил установить, что липосомы – липидные везикулы с двухслойной структурой мембраны – имеют все необходимые свойства для транспортировки любых лекарственных соединений.

Роль печени в метаболизме токсичных веществ предполагает, что ее клетки – гепатоциты часто подвергаются воздействию лекарств, микробов и токсичных субстанций, которые могут привести к различным заболеваниям этого органа. Заболевания печени ставят на пятое место по смертности. Гепатоцеллюлярная карцинома (НСС) является пятой по распространенности неоплазией в мире и третьим самым смертельным видом рака [1, 2]. За развитие НСС отвечают два главных типа вирусов гепатита: вирусы гепатита В и С (HBV и HCV, соответственно). Примерно 2 млрд. человек в мире инфицированы HBV, и 320 000 случаев ежегодно оказываются летальными [3], тогда как 170 млн. человек в мире оказываются зараженными HCV [4, 5]. Поскольку НСС и другие заболевания печени (фиброз и цирроз) в основном поражают гепатоциты [6], то направленная доставка терапевтических средств именно в эти клетки является наиболее логичным подходом. Чтобы разработать гепатоцит-направленную систему доставки, в качестве рецептора-мишени, часто встречающегося на поверхности гепатоцитов, но мало представленного на мембранах других клеток, был выбран асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R) [7].

Современные исследования направлены на поиск оптимальных структур гликолипидов, которые будут придавать таргетные свойства липосомам. Несколько систем доставки генов, основанных на подобных лигандах, показали воодушевляющие клинические результаты, привлекая внимание научного сообщества и демонстрируя перспективность нанотерапевтических подходов в медицине.

Строение и функции асиалогликопротеинового рецептора ASGP-R

ASGP-R, также известный как «рецептор Эшвелла–Морелла», был первым открытым в 1960-х годах в ходе исследований метаболизма гликопротеинов плазмы крови млекопитающих клеточным лекти-

ном млекопитающих [8, 9]. Основными функциями этого рецептора является распознавание клеточного фибронектина, протромбических компонентов, печеночных липопротеинов и иммуноглобулина А (IgA). Роль ASGP-R заключается в поддержании гомеостаза сывороточных гликопротеинов путем посредничества между узнаванием и эндоцитозом широкого спектра гликопротеинов, оканчивающихся остатками галактозы или *N*-ацетилгалактозамина [10]. Эти гликопротеины подвергаются эндоцитозу через клатрин-презентирующие участки, после чего они транспортируются в лизосомы для разрушения в кислых условиях. ASGP-R массово представлен на поверхности клеток паренхимы печени в количестве $(1-5) \times 10^5$ участков связывания на клетку [11]. Кроме того, взаимодействие рецептора с клеточными компонентами патогенов также является главной причиной генерализации некоторых заболеваний печени, в частности вызываемых вирусами гепатита А и В, а также вирусом Марбурга [12–15].

ASGP-R млекопитающих состоит из двух гомологичных полипептидных субъединиц (главной и вспомогательной), которые кодируются двумя определенными генами [13, 16]. У человека главная субъединица (H1) и вспомогательная субъединица (H2) имеют массу 46 и 50 кДа соответственно. Каждая субъединица является трансмембранным белком С-типа с коротким *N*-концом, расположенным в цитоплазме, внутренней частью, пронизывающей мембрану, и *C*-концом, оканчивающимся Ca^{2+} -зависимым доменом узнавания углеводов с внешней стороны мембраны [17]. Комбинация различных соотношений субъединиц образует функциональные гомо- и гетероолигомеры с различной конфигурацией рецептора. Было установлено, что наиболее часто встречающейся конфигурацией является конъюгат из двух H1-субъединиц и одной H2-субъединицы (рис. 1), он показывает наивысшую аффинность к лиганду ASOR (асиалооросомукоид), который аналогично лактоферрину, гликопротеину сыворотки крови, связывается с рецептором ASGP-R [11, 18].

Домен узнавания углеводов (CRD) в субъединицах ASGP-R принадлежит к семейству С-типа (Ca^{2+} -зависимые) [20]. Большинство доменов CRD С-типа селективно связываются с D-маннозой, D-глюкозой и их производными (лиганды Man-типа) или с D-галактозой и ее производными (лиганды Gal-типа). Связывание D-галактозы с рецептором (рис. 2) происходит в присутствии ионов Ca^{2+} в щелочных условиях [21–23]. ASGP-R обеспечивают протекание эндоцитоза по клатрин-опосредованному механизму [24]. Этот механизм реализуется при взаимодействии с трансмембранным рецептором, который запускает каскад сигнальных реакций и «пропускает» частицы внутрь. Клатриновые домены занимают всего

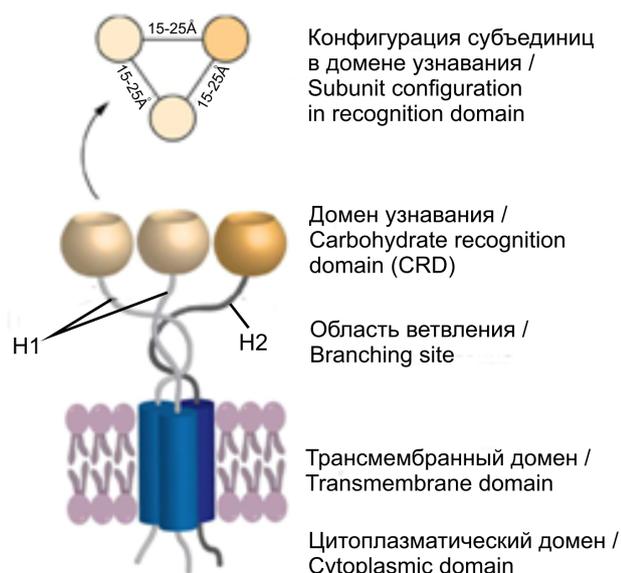


Рис. 1. Схематическое изображение ASGP-R, демонстрирующее гетероолигомер из двух субъединиц H1 и одной H2. На рисунке приведено пространственное расположение участков связывания рецептора [19].

Fig. 1. Schematic depiction of ASGP-R that showing a heterooligomer made up of two H1 subunits and one H2 subunit. The figure shows the spatial arrangement of the receptor's binding sites [19].

0.5–2% от всей площади поверхности клетки, то есть транспорт веществ путем клатрин-зависимого механизма является достаточно селективным процессом. Для успешного узнавания липосомы и другие соединения должны быть предварительно помечены аполипротеинами, которые широко встречаются в плазме крови [25]. После проникновения в клетку такой агрегат оказывается внутри ранней эндосомы, оболочка которой со временем сливается с внешней оболочкой липосомы, образуя позднюю эндосому. В зависимости от структуры исходной липосомы, ее заряда и наличия или отсутствия специальных лигандов на поверхности поздняя эндосома может либо под действием ферментов превратиться в лизосому, что приведет к уничтожению всего комплекса, либо транспортируемое содержимое будет высвобождено в цитоплазму, где сможет действовать на клеточные органеллы [26, 27]. В ходе исследования механизмов эндоцитоза и возможности их блокирования было обнаружено, что при 4 °C проникновения внутрь клеток не происходит, однако сам процесс узнавания молекул рецепторами сохраняется [28]. Поэтому при исследовании механизмов проникновения конкретной липосомальной конструкции в условиях пониженной температуры можно определить, является ли ее транспорт рецептор-зависимым и селективным. Также было установлено, что вирус гепатита С человека проникает в гепатоциты именно по этому механизму [29].

ASGP-R также был обнаружен на поверхности гепатоцитов других млекопитающих, включая кроликов [30], мышей [31] и крыс [32], хотя размер и количество субъединиц немного отличаются у разных видов млекопитающих. Несмотря на отличия в структуре рецептора у разных видов млекопитающих, последовательность аминокислот весьма консервативна и, возможно, происходит от одного общего гена. Например, субъединица H1 на 80% идентична крысиному лектину-1 (RHL1), а субъединица H2 схожа на 62% с RHL2 [33]. Этот факт позволяет проецировать данные *in vivo* экспериментов на ожидаемые результаты клинических исследований.

Принципы направленной доставки лекарственных соединений к клеткам печени

Известно, что при химиотерапии более 90% молекул цитостатических средств захватывается здоровыми тканями, и только 2–5% попадают в опухоли [34]. Поэтому важно создать такие системы доставки лекарств, которые были бы селективными и попадали только в целевые органы [35, 36]. Рецептор-опосре-

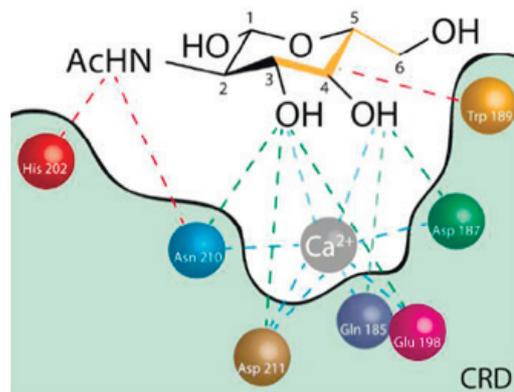


Рис. 2. Связывание молекулы *N*-ацетилгалактозамина (GalNAc) с доменом узнавания ASGP-R. Между гидроксильными группами при 3 и 4 атомах углерода в пиранозном кольце GalNAc и остатками аминокислот ¹⁸⁷Asp, ¹⁹⁸Glu, ¹⁸⁵Gln, ²¹¹Asp и ²¹⁰Asn взаимодействие осуществляется за счет водородных, а также координационных связей (при участии иона Ca²⁺). Атом водорода в амидной связи и неполярный участок GalNAc между 3 и 6 атомами углерода участвуют в создании гидрофобных взаимодействий с остатками аминокислот ²⁰²His и ¹⁸⁹Trp, соответственно [19].

Fig. 2. Binding of the *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) molecule to the recognition domain of ASGP-R.

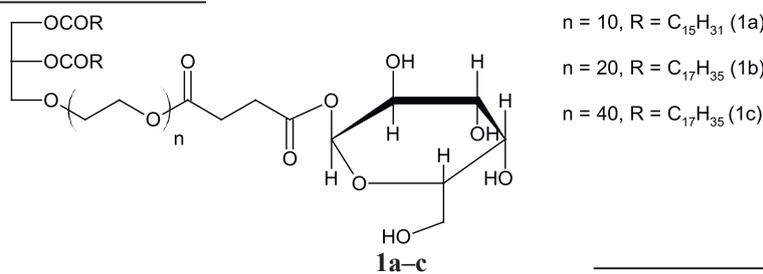
Between hydroxyl groups at 3 and 4 carbon atoms in the pyranose ring of GalNAc and ¹⁸⁷Asp, ¹⁹⁸Glu, ¹⁸⁵Gln, ²¹¹Asp and ²¹⁰Asn amino acid residues, the interaction is due to hydrogen as well as coordination bonds (with the participation of the Ca²⁺ ion). The hydrogen atom in the amide bond and the nonpolar GalNAc region between 3 and 6 carbon atoms participate in the creation of hydrophobic interactions with ²⁰²His and ¹⁸⁹Trp amino acid residues, respectively [19].

дованный эндоцитоз является весьма многообещающим способом направленной доставки лекарств благодаря достижению высоких концентраций последних в клетках-мишенях, что повышает эффективность препарата и снижает его побочные эффекты.

В ходе оптимизации взаимодействия носителя с рецептором было установлено, что на аффинитет влияет ряд свойств лиганда-углевода. Так, например, известно, что с доменом узнавания одинаково эффективно связываются и циклические производные D-галактозы, и D-галактозиды с разомкнутым циклом. Наиболее эффективно на рецептор воздействуют производные D-галактозы и D-глюкозы, лактоза и D-манноза демонстрируют меньшую активность в отношении гепатоцитов, но более активно связываются с рецепторами клеток Купффера [37]. Аффинность D-галактозы возрастает в 100–1000 раз при увеличении количества углеводных остатков на кон-

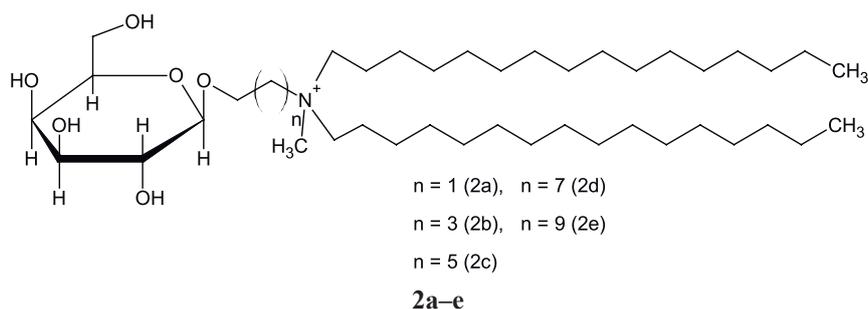
це одной молекулы лиганда от одного до трех-четырех за счет кластерного эффекта [38]. Таким образом, для нацеливания на ASGP-R могут быть использованы моновалентные и поливалентные лиганды.

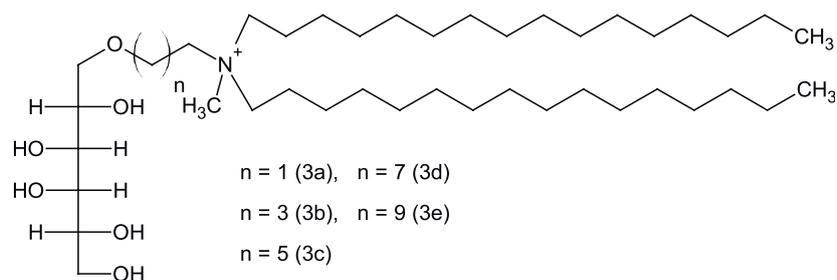
Расстояние, на котором находится остаток углевода от поверхности липосомы, является очень важным параметром при взаимодействии с лектинами [39, 40], при дизайне конструкций необходимо соблюсти минимальное расстояние между углеводом и поверхностью носителя [41, 42]. При отсутствии гидрофобного спейсера остатки углеводов не обращены в водную среду в достаточной степени, чтобы связаться с активными центрами рецепторов [43], однако избыточная длина спейсера может мешать их взаимодействию [44]. Это наблюдалось при изучении степени связывания гликолипидов **1a–c** с ConA (углевод-связывающий протеин, выделенный из овшей) в присутствии гликогена [45].



Теоретические и экспериментальные расчеты подтвердили, что более длинный спейсер придает остатку углевода большую мобильность (гликолипид **1c**), что обеспечивает более легкий доступ к участку связывания белка-рецептора. Так, например, D-галактозиды со спейсером длиной 20 Å связываются с рецептором даже при низкой концентрации, а со спейсером длиной в 4 Å требуют большего количества активных молекул [45]. Схожие данные были получены в экспериментах по снижению уровня холестерина в сыворотке крови: эффективная доза гликозидов со спейсерным участком длиной 20 Å оказалась в 30 раз меньше, чем у соединений со спейсерами длиной 4 Å [46]. Для спонтанного самопроизвольного связывания углеводного остатка с рецептором длина спейсера в среднем должна составлять 25–30 Å, причем если остаток углевода находится в циклической форме, то требуется чуть большее расстояние от поверхно-

сти наночастицы [47]. Однако существуют примеры эффективного использования и более коротких спейсеров длиной 15 [38], 11.05 [48] и 10.1 [49] Å. По-видимому, невозможно установить единую идеальную длину связующего звена для всех типов углеводсодержащих лигандов, и ее значение будет зависеть от природы спейсерного участка и типа углеводного остатка. Так, при изучении трансфекционной активности липоплексов на основе алифатических гликозидов, имеющих в своем ядре четвертичный атом азота, было установлено, что для циклической формы была необходима длина спейсера в 6 метиленовых единиц (**2a–e**), а для ациклической формы – только 2 метиленовых звена (**3a–e**) [50]. Также было замечено, что пиранозиды, имеющие гликозидную связь при 6-ом атоме углерода вне плоскости кольца, проникают в гепатоциты, минуя лизосомальную стадию, что увеличивает терапевтический эффект препарата [51].



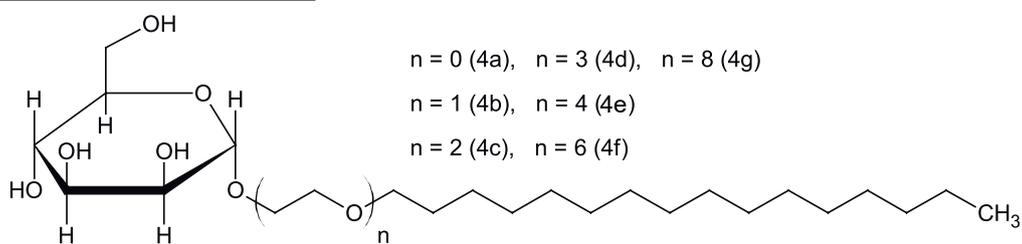


3a–e

Изучалось также влияние конфигурации хирального центра углеводного фрагмента – ряд исследований указывает на то, что α -гликозиды проявляют большую активность в отношении модельного растительного рецептора ConA [52] или клеточной линии HepG2, полученной на основе гепатоцитов [53], в сравнении с β -гликозидами.

Кроме того, при использовании липосом в качестве носителей нужно соблюдать минимальную эф-

фективную долю углеводных лигандов от общего липидного состава, это явление называется пороговым эффектом [54]. В ходе *in vitro* тестов на связывание модифицированных D-маннозой липосом (4a–g) с растительным лектином ConA было обнаружено, что минимальная эффективная доля D-маннозы для коротких спейсеров (2 оксиэтиленовых звена) составила 28%, в то время как для спейсера средней длины (6 звеньев) была уже ниже – 3%.



4a–g

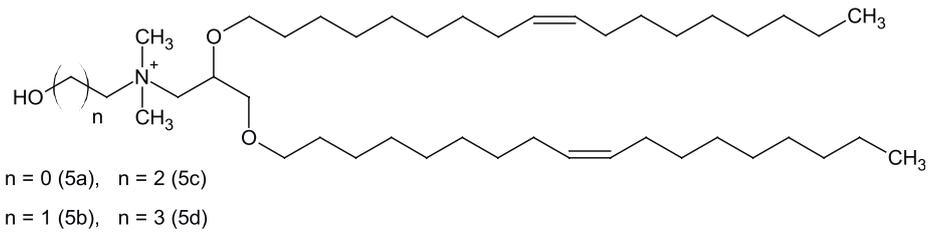
Для гликолипидов на основе D-лактозы с гидрофобным блоком, содержащим две алкильные цепи, и остатком янтарной кислоты в роли небольшого линкера пороговый эффект наблюдался при добавлении 5% полученного соединения к липосомальной композиции [55]. Кроме того, встречаются сведения о резком увеличении захвата углеводсодержащих частиц макрофагами после взаимодействия с Gal/Fuc-распознающими рецепторами на их поверхности в том случае, если доля модификации достигает 50% [56]. Введение в структуру липосом каркасообразующих липидов, таких как холестерин, уменьшает пороговую долю углеводов, а использование в качестве липидной матрицы ненасыщенных фосфатидилхолинов приводит к ее увеличению [57].

Стоит отметить, что не встречающиеся в природе оксиэтиленовые группы способны заменить природные остатки моносахаридов, имитируя длинную полисахаридную цепь. Данное свойство было показано при изучении эффективности связывания трех разных гликолипидов с растительным лектином RCA1 – эффективность связывания возрастала в ряду алифатических производных D-галактозы, D-лактозы и D-галактозы, с присоединенным к ней коротким оксиэтиленовым спейсером [43]. Кроме того, использование более длинных цепей полиэтиленгликолей (более 10 звеньев) создает эффект сте-

рической поверхностной защиты липосом от белков крови, приводя к пролонгированной циркуляции комплексов в крови. Увеличение содержания лиганда в составе липидной композиции приводит к более легкому проникновению в клетки печени, а наличие длинного гидрофильного спейсера замедляет выведение комплексов из крови [44].

Гидроксильные группы на конце углеводсодержащих лигандов могут способствовать не только контакту модифицированной липосомы с активным центром ASGP-R, но и усиливать трансфекционную активность комплексов таких везикул с нуклеиновыми кислотами. На основе ряда *in vitro* исследований биологической активности катионных липосом, где в структуре полярной «головки» липида присутствует гидроксильная группа (5a–d), было установлено, что образуемые комплексы с ДНК обладают большей стабильностью благодаря образованию водородных связей между поверхностью бислоя и молекулами нуклеиновой кислоты [58]. Причем, чем ближе эти группы расположены к положительно заряженному четвертичному атому азота (5a), тем эффективнее будет происходить комплексообразование [59].

Увеличение количества гидроксильных групп в составе катионных липидов тоже положительно сказывается на показателях эффективности трансфекции [60]. Гидроксильные группы на конце липидов



5a–d

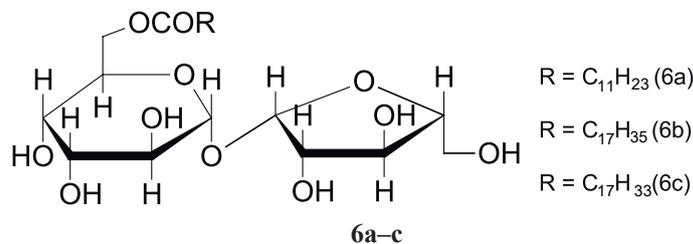
в составе бислоя выполняют функцию, аналогичную цепям ПЭГ (полиэтиленгликоля), формируя небольшую защитную оболочку вокруг липосомы, из-за чего гликозидсодержащие частицы могут дольше циркулировать в крови по сравнению с катионными дисперсиями [50].

Таким образом, для дизайна подобных лигандов важными деталями являются: длина спейсерного участка, гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) молекулы и ее пространственная геометрия.

Успехи создания липосомальных препаратов для терапии заболеваний печени

Катионные липосомы, состоящие из аналогов природных липидов, могут иметь значительно более высокую эффективность доставки генов по сравнению с липосомами на основе фосфолипидов благодаря их особенной структуре бислоя [61]. Однако такие конъюгаты требуют обязательного наличия вспомогательных (хелперных) липидов, играющих важную роль в формировании липоплек-

сов из катионных липосом и нуклеиновых кислот и определяющих их морфологию [62]. В качестве таких вспомогательных липидов в одной из работ были использованы алифатические эфиры сахарозы, где гидрофобный домен был представлен остатками различных жирных кислот (6a–c). Увеличивая трансфекционную активность липоплексов в условиях *in vitro* и *in vivo*, они показали свою высокую эффективность [63]. Клеточный захват модифицированных катионных липосом возрос на 20–30%, в то время как уровень цитотоксичности снизился на 20–60%. Однако структура таких эфиров может оказывать большое влияние как на эффективность трансфекции, так и на токсичность липосом, поэтому выбор длины и типа остатка жирной кислоты играет немалую роль. Результаты исследований показывают, что размер липосом постепенно уменьшается с увеличением значений ГЛБ; в среднем, диаметр липосом, имеющих в составе производные лауриновой кислоты (6a), был меньше, чем у липосом со стеариновыми эфирами стеариновой кислоты (6b), даже при равном значении ГЛБ.

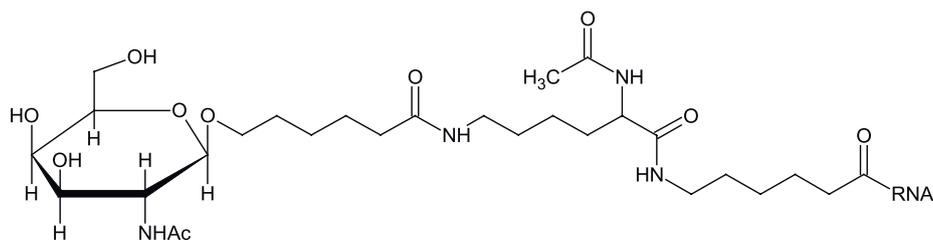


Длина гидрофобной области также может влиять на стабильность и текучесть липосом: показано, что алкильные цепи с 12 атомами углерода дают самую лучшую степень проникновения в клетку по сравнению с более короткими (6–10 атомов) или более длинными (>14 атомов) [64]. Таким образом, эфиры сахарозы с короткими цепями (остатки лауриновой кислоты) и значениями ГЛБ, равными 6, позволяли формировать липосомы, обеспечивающие весьма высокий уровень трансфекции плазмидной ДНК и подавления роста опухоли у мышей [65].

Существует много исследований, которые показывают, что повышения эффективности трансфекции и генетического сайленсинга в клетках печени можно добиться даже при простой конъюгации гликозида с молекулой ДНК или РНК. Было доказано, что направленная доставка генетического материала для лечения HCV

при наличии такой модификации увеличивает уровень проникновения нуклеиновой кислоты в клетки в 10 раз [66]. Присоединение к антисмысловому олигонуклеотиду даже одного остатка GalNAc (7) значительно повышает эффективность доставки биологически активной молекулы. В качестве спейсера и разветвляющего агента в данном случае был использован лизин.

Кроме агентов генной терапии, направленно в клетки печени довольно успешно транспортируются и химиотерапевтические препараты. В одном из исследований катионные липосомы, переносящие доксорубин, были покрыты остатками D-галактозы на этапе формирования липосомального контейнера. *In vitro* эксперименты по цитотоксичности подтвердили селективность доставки терапевтических агентов к клеткам Huh-7 (гепатокарциномы человека), имеющим на поверхности ASGP-R, причем цитоток-



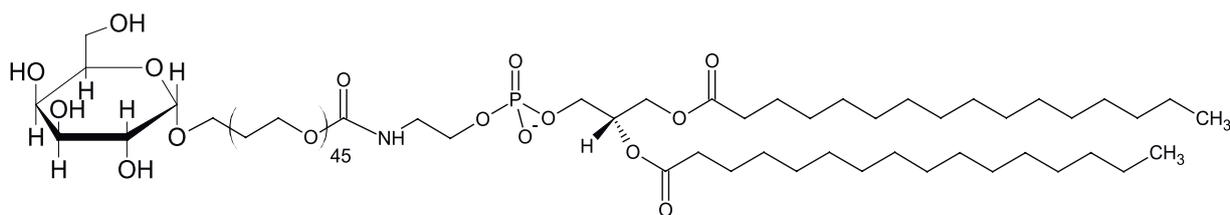
7

сический эффект был дозозависимым, то есть возрастал с увеличением концентрации липосом в лунке планшета [66].

Для получения другого таргетного противоопухолевого препарата были получены липосомы с инкапсулированным оксалиплатином, поверхность которых была покрыта лактобионовой кислотой – дисахаридом, представляющим собой полигидроксикислоту. В качестве препаратов сравнения использовался сам цитостатик и немодифицированные нагруженные липосомы. Флуоресцентные метки позволили увидеть, что добавление на поверхность липосом углевода привело к 3-х-кратному увеличению концентрации

везикул в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [68]. Оксалиплатин, переносимый таргетными липосомами, проявлял более сильное токсическое действие по отношению к данным раковым клеткам по сравнению с простым препаратом и немодифицированными липосомами.

Конфокальная микроскопия с использованием контрастного окрашивания органоидов позволяет изучить процесс накопления липосом в клетках-мишенях. Присоединение остатков D-галактозы на поверхность катионных липосом по аминогруппе липида DSPE (8) привело к значительному увеличению уровня захвата гепатоцитами линии Hep G2 [69].

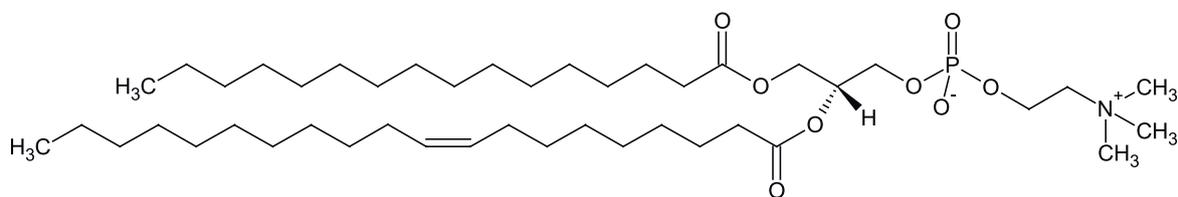


8

Коинкубация клеток с липосомами и специфичными ингибиторами слияния, такими как индометацин и хлорпромазин, показала, что добавление этих соединений сильно снижает количество модифицированных липосом внутри клеток [69]. Известно, что хлорпромазин блокирует клатрин-зависимый эндоцитоз, а индометацин – кавеолин-зависимый, поэтому подобное исследование не только подтверждает, что проникновение углеводсодержащих частиц в гепатоциты

происходит по клатрин-зависимому рецепторопосредованному механизму, но и указывает на реализацию процесса кавеолин-зависимого захвата, который отвечает за проникновение большинства болезнетворных микроорганизмов сложного строения, а также вирусов.

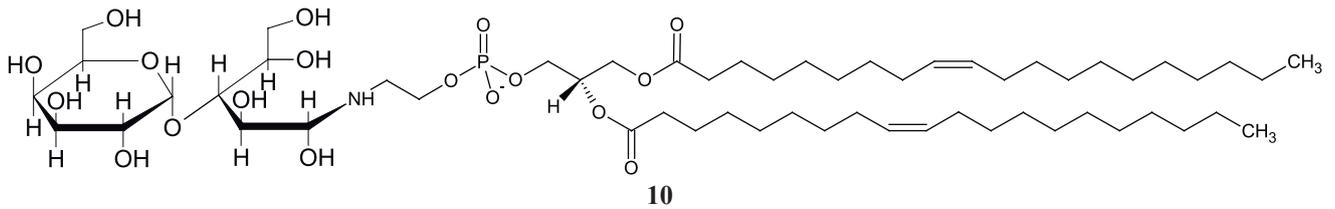
Сформированы и изучены катионные липосомы, содержащие в своем составе D-галактолипид и вспомогательный липид POPC (9) в различных соотношениях [70].



9

После проведения *in vitro* тестов было установлено, что захват липосом клетками линии Huh-7 возрастал с увеличением содержания углеводсодержащего липида в составе липидной матрицы. Углеводсодержащие липосомы давали почти в 2 раза более высокий уровень сайленсинга VEGF-генов, отвечающих за развитие

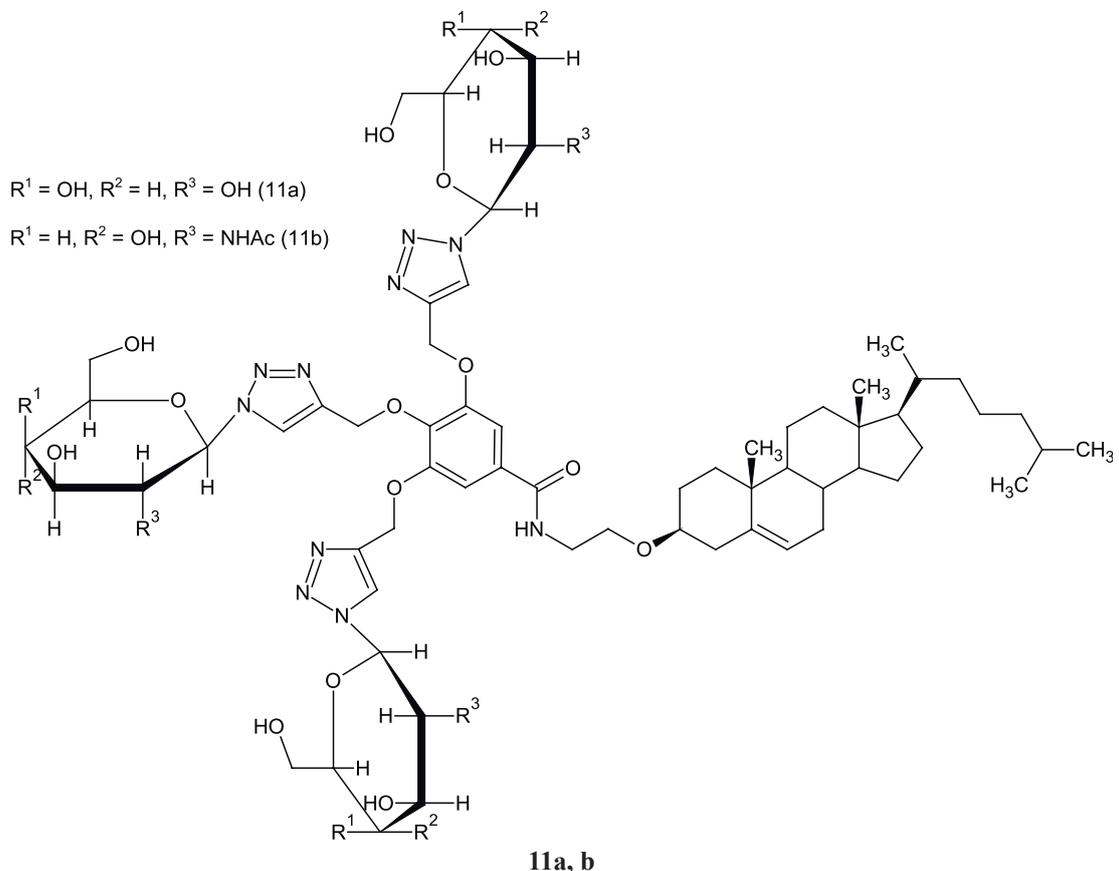
опухолей плоского эпителия, по сравнению с простыми катионными. Было показано, что при введении в состав липосомы гликолипида, полученного реакцией между лактозой и липидом DOPE (10), уже не требуется никакого дополнительного вспомогательного липида для их успешного выхода из эндосом.



In vivo исследование фармакокинетики подтвердило, что захват липоплексов клетками печени происходит по рецептор-опосредованному механизму, так как уже через 5 мин от начала эксперимента большая часть модифицированных комплексов находилась в печени, в то время как обычные катионные липосомы в основном оставались в плазме крови [70].

В другом *in vivo* эксперименте на мышах линии BALB/c также было показано более быстрое выведение гликозилированных липосом по сравнению с

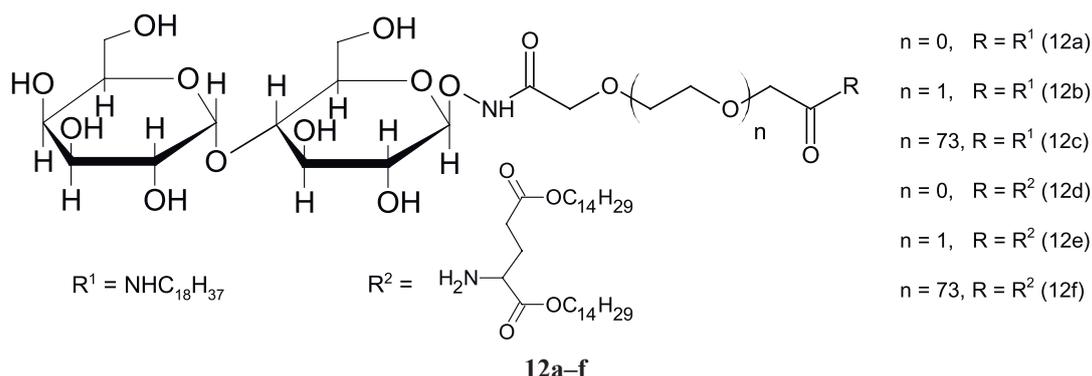
катионными липосомами на основе фосфатидилхолинов и холестерина [71]. Для исследования было синтезировано два гликоконъюгата на основе холестерина, содержащих D-галактозу (**11a**) или N-ацетил-D-глюкозамин (**11b**). Через 20 мин от начала эксперимента модифицированные липосомы практически не наблюдались в крови, а находились в печени, селезенке и почках. Причем липосомы, имеющие на поверхности остатки D-галактозы, быстрее попадали из крови в печень.



Были синтезированы гликолипиды на основе D-лактозы со спейсерами различной длины, представленными ди-, три- и полиэтиленгликолем. Эти соединения (**12a–f**) в количестве 5% добавлялись к липидам при формировании бислоя, после чего была изучена эффективность связывания всех трех модифицированных липосом с рецептором RCA1 [72].

Предполагалось, что наиболее длинный спейсер (ПЭГ) (**12c, f**) обеспечит самую высокую аффинность комплексов за счет большего расстояния между поверхностью везикулы и углеводной частью, однако по результатам *in vitro* теста самым успеш-

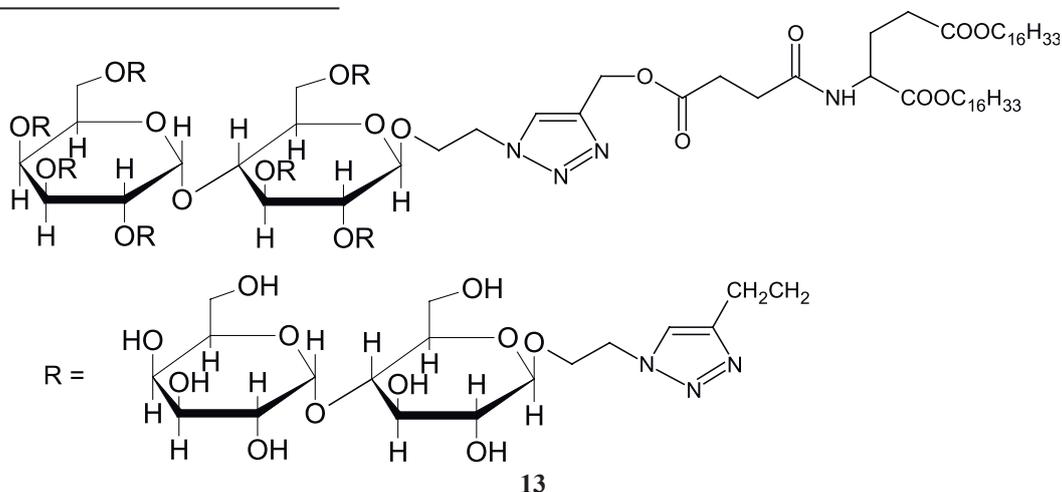
ным оказался лиганд с триэтиленгликолевым спейсерным участком (**12b, e**) [72]. Было предположено, что слишком длинные цепи ПЭГ выполняют роль барьера между рецепторами и углеводсодержащими лигандами, препятствуя их взаимодействию. Аналогичный эксперимент проводился и с D-лактозидом (**13**), содержащим 7 остатков лактозы, присоединенных к липопептиду через 1,2,3-триазольный цикл [73]. Полученные результаты подтвердили, что поливалентные гликолипиды также являются весьма перспективными молекулами для формирования модифицированных липосом таргетного действия.



12a-f

Гликолипид (13) был введен в качестве лиганда в структуру катионной липосомы для изучения его влияния на эффективность трансфекции в отношении клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. В качестве лигандов другого типа был исполь-

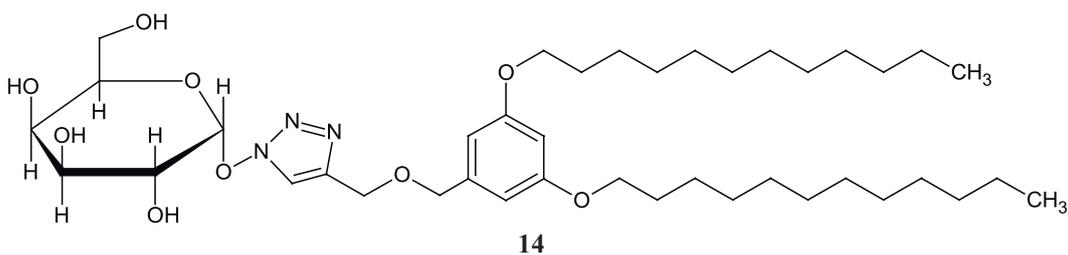
зован аналогичный гликолипид, содержащий только один остаток D-лактозы. Оказалось, что разветвленный лиганд снижает трансфекционную активность липосомального комплекса, переносящего плазмиду, из-за стерических затруднений и эффекта экранирования [74].



13

Исследования гликолипид-содержащих липосом с триазольным циклом в структуре представлены как в российской, так и зарубежной литературе, что свидетельствует об удобстве подходов формирова-

ния такой связи между липофильной и гидрофильной частями [23, 75]. Причем в качестве линкерного участка в производном D-галактозы (14) выступает бензольное кольцо [75].



14

Заключение

Липосомальные системы доставки хорошо подходят как для переноса противоопухолевых препаратов, так и для транспорта нуклеиновых кислот. Они позволяют создавать стабильные и эффективные препараты, которые имеют гораздо меньше побочных эффектов, чем исходное действующее вещество. Однако такие системы доставки могут оказывать токсический и иммунологический эффекты из-за неизбирательного распределения частиц по организ-

му и достаточно крупного размера по сравнению с другими системами доставки, что приводит к активации защитных систем организма. Кроме того, липоплексы недостаточно эффективно высвобождают свое содержимое после проникновения в клетку. Следует добиваться эффекта направленной доставки препарата к целевому органу за счет добавления на поверхность липосом специфических лигандов. Гликолипиды на основе D-углеводов в составе липосом обеспечивают их проникновение в клетки печени по механизму рецептор-опосредованного клат-

рин-зависимого эндоцитоза, который активируется при контакте углеводсодержащей части лиганда с активным центром асиалогликопротеинового рецептора (ASGP-R). Показано, что для этого можно использовать как моновалентные производные углеводов, так и поливалентные гликоконъюгаты. Варьируя структуру лиганда и количество добавляемых к липосоме модификаций, можно достичь наибольшего терапевтического эффекта. Огромное влияние на аффинность и клеточный ответ оказывают расстояние от поверхности липосомы до углеводного остатка (длина спейсера) и гидрофильно-липофильный баланс (ГЛБ) молекулы лиганда.

В целом, для обеспечения минимального эффекта от взаимодействия модифицированной частицы с асиалогликопротеиновыми рецепторами клеток необходимо добавлять в ее состав специфичный лиганд в количестве 5%, а расстояние между поверхностью липосомы и углеводным остатком должно составлять примерно 10 Å. Наличие в составе катионной липосомы гликолипидов ускоряет процесс проникновения внутрь клетки не только за счет рецепторопосредованного механизма, но также благодаря

изменению физико-химических свойств поверхности частицы. Подтвержденные результатами ряда исследований данные о более легком процессе выхода модифицированных липосомальных комплексов из эндосом по сравнению со стандартными катионными липосомами позволяет предположить, что гликолипиды выполняют также и вспомогательную функцию. Углеводсодержащие липосомы способны эффективно доставлять в целевые клетки как генетический материал, так и цитостатические препараты, что свидетельствует о возможности применения подобных препаратов против широкого спектра заболеваний печени.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 17-04-01141 и № 19-04-00775).

Acknowledgments

This work was carried out with the financial support of the Russian Foundation for Basic Research (RFBR), projects No. 17-04-01141 and No. 19-04-00775.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.
The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References:

1. Farazi P.A., DePinho R.A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. *Nat. Rev.* 2006;6:674-687. <https://doi.org/10.1038/nrc1934>
2. Llovet J.M., Burroughs A., Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003;362:1907-1917. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14964-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14964-1)
3. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 2004;11:97-107. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2003.00487.x>
4. Jong Y.P. De, Rice C.M., Ploss A. Editorial evaluation of combination therapy against hepatitis C virus infection in human liver chimeric mice. *J. Hepatol.* 2011;54(5):848-850. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.09.034>
5. Shulla A., Randall G. Hepatitis C virus-host interactions. In: Hepatitis C Virus I. / T. Miyamura, S.M. Lemon, C.M. Walker, T. Wakita (eds). Springer Japan, 2016; pp. 197-233. <https://doi.org/10.1007/978-4-431-56098-2>
6. Eisenberg C., Seta N., Appel M., Feldmann G. Asialoglycoprotein receptor in human isolated hepatocytes from normal liver and its apparent increase in liver with histological alterations. *J. Hepatol.* 1991;13:305-309. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278\(91\)90073-K](http://dx.doi.org/10.1016/0168-8278(91)90073-K)
7. Poelstra K., Prakash J., Beljaars L. Drug targeting to the diseased liver. *J. Control. Release.* 2012;161(2):188-197. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.02.011>
8. Grewal P.K. The Ashwell-Morell Receptor. In: *Methods in Enzymology.* California: Elsevier Inc., 2010. Iss.1; pp. 223-241. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)79013-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)79013-3)
9. Ashwell G., Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* 1982;51(2):531-554. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.002531>
10. Hubbard A.L., Stukenbrok H. An electron microscope autoradiographic study of the carbohydrate recognition systems in rat liver. *J. Cell. Biol.* 1979;83:65-81. <https://doi.org/10.1083/jcb.83.1.65>
11. Hardy M.R., Townsend R.R., Parkhurst S.M., Lee Y.C. Different modes of ligand binding to the hepatic galactose/N-acetylgalactosamine lectin on the surface of rabbit hepatocytes. *Biochemistry.* 1985;24:22-28. <https://doi.org/10.1021/bi00322a004>
12. Dotzauer A., Gebhardt U., Bieback K., Göttke U., Kracke A., Mages J., Lemon S.M., Vallbracht A. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. *J. Virol.* 2002;74(23):10950-10957. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.23.10950-10957.2000>
13. Treichel U., Meyer zum Büschenfelde K.H., Stockert R.J., Poralla T. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J. Gen. Virol.* 1994;75(11):3021-3029. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-11-3021>
14. Becker S., Spiess M., Klenk H.D. The asialoglycoprotein receptor is a potential liver-specific receptor for Marburg virus. *J. Gen. Virol.* 1995;76(2):393-399. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-2-393>
15. Treichel U., Meyer zum Büschenfelde K.H., Dienes H.P., Gerken G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch. Virol.* 1997;142(3):493-498. <https://doi.org/10.1007/s007050050095>
16. Weigel P.H., Yik J.H.N. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002;1572:341-363. <https://doi.org/10.1109/vetecs.2000.851386>

17. Cummings R.D., McEver R.P. C-type Lectins. Essentials of Glycobiology. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Iss. 2: 784 p.
18. Bischoffs J., Lodish H.F. Two asialoglycoprotein receptor polypeptides in human hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 1987;262(24):11825-11832.
19. Huang X., Leroux J.-C., Castagner B. Well-defined multivalent ligands for hepatocytes targeting via asialoglycoprotein receptor. *Bioconjug. Chem.* 2017;28(2):283-295. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00651>
20. Henis Y.I., Katzir Z., Shia M.A., Lodish H.F. Oligomeric structure of the human asialoglycoprotein receptor: Nature and stoichiometry of mutual complexes containing H1 and H2 polypeptides assessed by fluorescence photobleaching recovery. *J. Cell Biol.* 1990;111(4):1409-1418. <https://doi.org/10.1083/jcb.111.4.1409>
21. McAbee D.D., Jiang X., Walsh K.B. Lactoferrin binding to the rat asialoglycoprotein receptor requires the receptor's lectin properties. *Biochem. J.* 2000;348:113-117. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480113>
22. Weis W.I., Taylor M.E., Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* 1998;163:19-34. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1998.tb01185.x>
23. Шуина Е.Д., Щелик И.С., Себякин Ю.Л. Синтез и свойства неогликолипидов на основе 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диола. *Тонкие химические технологии.* 2017;12(4):65-74. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2017-12-4-65-74>
- [Shuina E.D., Shchelick I.S., Sebyakin Yu.L. Synthesis and properties of neoglycolipids based on 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol. *Tonkie Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2017;12(4):65-74 (in Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2017-12-4-65-74>]
24. Kawakami S., Hashida M. Glycosylation-mediated targeting of carriers. *J. Control. Release.* 2014;190:542-555. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.001>
25. Digiacomo L., Cardarelli F., Pozzi D., Palchetti S., Digman M.A., Gratton E., Capriotti A.L., Mahmoudi M., Caracciolo G. An apolipoprotein-enriched biomolecular corona switches the cellular uptake mechanism and trafficking pathway of lipid nanoparticles. *Nanoscale.* 2017;9(44):17254-17262. <https://doi.org/10.1039/c7nr06437c>
26. Futter C.E., Pearse A., Hewlett L.J., Hopkins C.R. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J. Cell Biol.* 1996;132(6):1011-1023. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.6.1011>
27. Luzio J.P., Rous B.A., Bright N.A., Pryor P.R., Mullock B.M., Piper R.C. Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell Sci.* 2000;113:1515-1524.
28. Banizs A.B., Huang T., Nakamoto R.K., Shi W. Endocytosis pathways of endothelial cell derived exosomes. *Mol. Pharm.* 2018;15(12):5585-5590. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00765>
29. Douam F., Lavellette D., Cosset F.L. The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015;129:63-107. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2014.10.003>
30. Kawasaki T., Ashwell G. Carbohydrate structure of glycopeptides isolated from an hepatic membrane-binding protein specific for asialoglycoproteins. *J. Biol. Chem.* 1976;251(17):5292-5299.
31. Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature.* 1992;360:127-134. <https://doi.org/10.1038/360127a0>
32. Drickamer K., Mamon J.F., Binns G., Leung J.O. Primary structure of the rat liver asialoglycoprotein receptor. Structural evidence for multiple polypeptide species. *J. Biol. Chem.* 1984;259(2):770-778.
33. Hong W., Le A. Van, Doyle D. Identification and characterization of a murine receptor for galactose-terminated glycoproteins. *Hepatology.* 1988;8(3):553-558. <https://doi.org/10.1002/hep.1840080320>
34. Guan M., Zhou Yi, Zhu Q.-L., Liu Y. N-Trimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2012;8(7):1172-1181. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.01.009>
35. D'Souza A.A., Devarajan P. V. Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting – Strategies and applications. *J. Control. Release.* 2015;203:126-139. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.022>
36. Yoshino K., Nakamura K., Terajima Y., Kurita A. Comparative studies of irinotecan-loaded polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2012;1818(11):2901-2907. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.07.011>
37. Franssen E.J.F., Jansen R.W., Vaalburg M., Meijer D.K. Hepatic and intrahepatic targeting of an anti-inflammatory agent with human serum albumin and neoglycoproteins as carrier molecules. *Biochem. Pharmacol.* 1993;45(6):1215-1226. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90273-Y](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90273-Y)
38. Rensen P.C.N., Sliedregt L.A., Ferns M., Kieviet E., van Rossenberg S.M., van Leeuwen S.H., van Berkel T.J., Biessen E.A. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 2001;276(40):37577-37584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101786200>
39. Engel A., Chatterjee S.K., Al-Arifi A., Reiemann D., Langner J., Nuhn P. Influence of spacer length on interaction of mannosylated liposomes with human phagocytic cells. *Pharm. Res.* 2003;20(1):51-57. <https://doi.org/10.1023/A:1022294624256>
40. Makky A., Michel J.-P., Maillaed P., Rosilio V. Biomimetic liposomes and planar supported bilayers for the assessment of glycodendrimeric porphyrins interaction with an immobilized lectin. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2011;1808(3):656-666. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.11.028>
41. Sundler R. Studies on the effective size of phospholipid headgroups in bilayer vesicles using lectin-glycolipid interaction as a steric probe. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984;771:59-67. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90110-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90110-X)
42. Sasaki A., Murahashi N., Yamada H., Morikawa A. Syntheses of novel galactosyl ligands for liposomes and their accumulation in the rat liver. *Biol. Pharm. Bull.* 1994;17(5):680-685. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.680>
43. Yoshioka H., Ohmura T., Hasegawa M., Hirota S., Makino M., Kamiya M. Synthesis of galactose derivatives that render lectin-induced agglutinating ability to liposomes. *J. Pharm. Sci.* 1993;82(3):273-275. <https://doi.org/10.1002/jps.2600820311>
44. Shimada K., Kamps J.A., Regts J., Ikeda K., Shiozawa T., Hirota S., Scherphof G.L. Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglycerol-poly(ethyleneglycol)s. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 1997;1326(2):329-341. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(97\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(97)00036-9)

45. Valentijn A.R.P.M., van der Marel G.A., Sliedregt L., van Berkel T. Solid-phase synthesis of lysine-based cluster galactosides receptor with high affinity for the asialoglycoprotein receptor. *Tetrahedron*. 1997;53(2):759-770. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(96\)01018-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(96)01018-6)
46. Biessen E.A.L., Broxterman H., van Boom J.H., van Berkel T.J. The cholesterol derivative of a triantennary galactoside with high affinity for the hepatic asialoglycoprotein receptor: A potent cholesterol lowering agent. *J. Med. Chem.* 1995;38:1846-1852. <https://doi.org/10.1021/jm00011a003>
47. Singh M., Ariatti M. Targeted gene delivery into HepG2 cells using complexes containing DNA, cationized asialoorosomucoid and activated cationic liposomes. *J. Control. Release*. 2003;92(3):383-394. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00360-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00360-2)
48. Носова А.С., Колоскова О.О., Шиловский И.П., Себякин Ю.Л., Хайтов М.Р. Гликоконъюгаты на основе лактозы со спейсерами различной длины для создания транспортных систем к клеткам печени. *Биомедицинская химия*. 2017;63(5):467-471. <https://dx.doi.org/10.18097/PBMC20176305467>
[Nosova A.S., Koloskova O.O., Shilovskiy I.P., Sebyakin Yu.L., Khaitov M.R. Lactose-based glycoconjugates with variable spacers for design of liver-targeted liposomes. *Biomeditsinskaya khimiya* [Biomedical Chemistry]. 2017;63(5):467-471 (in Russ.) <https://dx.doi.org/10.18097/PBMC20176305467>]
49. Prakash T.P., Yu J., Migawa M.T., Kinberger G.A., Wan W.B., Østergaard M.E., Carty R.L., Vasquez G. Comprehensive structure activity relationship of triantennary *N*-acetylgalactosamine conjugated antisense oligonucleotides for targeted delivery to hepatocytes. *J. Med. Chem.* 2016; 59(6):2718-2733. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01948>
50. Mukthavaram R., Marepally S., Venkata M.Y., Vegi G.N., Sistla R., Chaudhuri A. Cationic glycolipids with cyclic and open galactose head groups for the selective targeting of genes to mouse liver. *Biomaterials*. 2009;30(12):2369-2384. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.074>
51. Sun P., He Y., Lin M., Zhao Y. Glyco-regioisomerism effect on lectin-binding and cell-uptake pathway of glycopolymer-containing nanoparticles. *ACS Macro Lett.* 2014;3:96-101. <https://doi.org/10.1021/mz400577p>
52. Fukuda I., Mochizuki S., Sakurai K. Macrophage-targeting gene delivery using a micelle composed of mannose-modified lipid with triazole ring and dioleoyl trimethylammonium propane. *Biomol. Res. Int.* 2015;(10):1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/350580>
53. Monestier M., Charbonnier P., Gateau C., Cuillel M., Robert F., Lebrun C., Mintz E., Renaudet O., Delangle P. ASGPR-mediated uptake of multivalent glycoconjugates for drug delivery in hepatocytes. *ChemBioChem*. 2016;17:590-594. <https://doi.org/10.1002/cbic.201600023>
54. Grant C.W.M., Peters M.W. Lectin-membrane interactions information from model systems. *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Biomembr.* 1984;779(4):403-422. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(84\)90018-2](https://doi.org/10.1016/0304-4157(84)90018-2)
55. Koloskova O.O., Budanova U.A., Shchelik I.C., Shilovskii I.P., Khaitov M.R., Sebyakin Y.L. Examination the properties of lipopeptide liposomes modified by glycoconjugates. *Nano Hybrids Compos.* 2017;13:82-88. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/NHC.13.82>
56. Sliedregt L.A.J.M., Rensen P.C., Rump E.T., van Santbrink P.J., Bijsterbosch M.K., Valentijn A.R., van der Marel G.A., van Boom J.H., van Berkel T.J., Biessen E.A. Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J. Med. Chem.* 1999;42:609-618. <https://doi.org/10.1021/jm981078h>
57. Engel A., Chatterjee S.K., Al-Arifi A., Nuhn P. Influence of spacer length on the agglutination of glycolipid-incorporated liposomes by ConA as model membrane. *J. Pharm. Sci.* 2003;92(11):2229-2235. <https://doi.org/10.1002/jps.10481>
58. Narang A.S., Thoma L., Miller D.D., Mahato R.I. Cationic lipids with increased DNA binding affinity for nonviral gene transfer in dividing and nondividing cells. *Bioconjug. Chem.* 2005;16(1):156-168. <https://doi.org/10.1021/bc049818q>
59. Felgner J.H., Kumar R., Sridhar C.N., Wheeler C.J., Tsai Y.J., Border R., Ramsey P., Martin M., Felgner P.L. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J. Biol. Chem.* 1994;269(4):2550-2561.
60. Maiti B., Kamra M., Karande A.A., Bhattacharya S. Transfection efficiencies of α -tocopherylated cationic gemini lipids with hydroxyethyl bearing headgroups under high serum conditions. *Org. Biomol. Chem.* 2018;11:1983-1993. <https://doi.org/10.1039/c7ob02835k>
61. Li H., Hao Y., Wang N., Wang L., Jia S., Wang Y., Yang L., Zhang Y., Zhang Z. DOTAP functionalizing single-walled carbon nanotubes as non-viral vectors for efficient intracellular siRNA delivery. *Drug. Deliv.* 2016;23(3):840-848. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.919542>
62. Berchel M., Akhter S., Berthe W., Gonçalves C., Dubuisson M., Pichon C., Jaffrès P.-A., Midoux P. Synthesis of α -amino-lipophosphonates as cationic lipids or co-lipids for DNA transfection in dendritic cells. *J. Mater. Chem. B.* 2017;5(33):6869-6881. <https://doi.org/10.1039/c7tb01080j>
63. Zhao Y., Zhu J., Zhou H., Guo X., Tian T., Cui S., Zhen Y., Zhang S., Xu Y. Sucrose ester based cationic liposomes as effective non-viral gene vectors for gene delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016;145:454-461. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.05.033>
64. Chesnoy S., Huang L. Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000;29:27-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.27>
65. Zhao Y., Liu A., Du Y., Cao Y., Zhang E., Zhou Q., Hai H., Zhen Y., Zhang S. Effects of sucrose ester structures on liposome-mediated gene delivery. *Acta Biomater.* 2018;72:278-286. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.031>
66. Kinberger G.A., Prakash T.P., Yu J., Vasquez G., Low A., Chappell A., Schmidt K., Murray H.M., Gaus H., Swayze E.E., Seth P.P. Conjugation of mono and di-GalNAc sugars enhances the potency of antisense oligonucleotides via ASGR mediated delivery to hepatocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016;26(15):3690-3693. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.05.084>
67. Oh H.R., Jo H.Y., Park J.S., Kim D.E., Cho J.Y., Kim P.H., Kim K.S. Galactosylated liposomes for targeted co-delivery of doxorubicin/vimentin siRNA to hepatocellular carcinoma. *Nanomaterials*. 2016;6(141). <https://doi.org/10.3390/nano6080141>
68. Bansal D., Yadav K., Pandey V., Ganeshpurkar A., Agnihotri A., Dubey N. Lactobionic acid coupled liposomes: An innovative strategy for targeting hepatocellular carcinoma. *Drug Deliv.* 2016;23(1):140-146. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.907373>
69. Liu X., Han M., Xu J., Geng S., Zhang Y., Ye X., Gou J., Yin T., He H., Tang X. Asialoglycoprotein receptor-targeted liposomes loaded with a norcantharimide derivative for hepatocyte-selective targeting. *Int. J. Pharm.* 2017;520(1-2):98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.010>

70. Sonoke S.S., Ueda T., Fujiwara K., Kuwabara K., Yano J. Galactose-modified cationic liposomes as a liver-targeting delivery system for small interfering RNA. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34(8):1338-1342. <https://doi.org/10.1248/bpb.34.1338>

71. De Silva A.T.M., Maia A.L.C., de Oliveira Silva J., de Barros A.L.B., Soares D.C.F., de Magalhães M.T.Q., José Alves R., Ramaldes G.A. Synthesis of cholesterol-based neoglycoconjugates and their use in the preparation of liposomes for active liver targeting. *Carbohydr. Res.* 2018;465:52-57. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.008>

72. Gur'eva L.Y., Bol'sheborodova A.K., Sebyakin Y.L. Design, synthesis, and properties of neoglycolipids based on ethylene glycoles conjugated with lactose as components of targeted delivery systems of biologically active compounds. *Russ. J. Org. Chem.* 2012;48(8):1047-1054. <https://doi.org/10.1134/S1070428012080039>

73. Budanova U.A., Shchelik I., Koloskova O., Sebyakin Y.L. Multivalent glycoconjugate as the vector of target delivery of bioactive compounds. *Mendeleev Commun.* 2016;26(3):205-206. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2016.04.008>

74. Koloskova O.O., Nosova A.S., Shchelik I.S., Shilovskiy I., Sebyakin Y.L., Khaitov M.R. Liver-targeted delivery of nucleic acid by liposomes modified with a glycoconjugate. *Mendeleev Commun.* 2017;27(6):626-627. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mencom.2017.11.030>

75. Sakashita M., Mochizuki S., Sakurai K. Hepatocyte-targeting gene delivery using a lipoplex composed of galactose-modified aromatic lipid synthesized with click chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* 2014;22(19):5212-5219. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.08.012>

Об авторах:

Носова Анастасия Сергеевна, магистр кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, д. 86). <https://orcid.org/0000-0002-4905-8911>

Буданова Ульяна Александровна, кандидат химических наук, ассистент кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, 86). Scopus Author ID 14622352500, ResearcherID E-1659-2014, <https://orcid.org/0000-0003-1702-9435>

Себякин Юрий Львович, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры химии и технологии биологически активных соединений, медицинской и органической химии им. Н.А. Преображенского Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (Россия, 119571, Москва, пр. Вернадского, 86). Scopus Author ID 6701455145, ResearcherID T-2835-2019, <https://orcid.org/0000-0002-7027-378X>

About the authors:

Anastasiya S. Nosova, Master of the N.A. Preobrazhensky Chair of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). <https://orcid.org/0000-0002-4905-8911>

Ulyana A. Budanova, Cand. of Sci. (Chemistry), Assistant of Professor of the N.A. Preobrazhensky Chair of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). Scopus Author ID 14622352500, ResearcherID E-1659-2014, <https://orcid.org/0000-0003-1702-9435>

Yury L. Sebyakin, Dr. of Sci. (Chemistry), Professor, Professor of the N.A. Preobrazhensky Chair of Chemistry and Technology of Biologically Active Compounds, Medical and Organic Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). Scopus Author ID 6701455145, ResearcherID T-2835-2019, <https://orcid.org/0000-0002-7027-378X>

*Поступила: 28.08.2019; Получена после доработки: 25.09.2019; Принята к опубликованию: 16.10.2019.
Submitted: August 28, 2019; Reviewed: September 25, 2019; Accepted: October 16, 2019.*