

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛИПОСОМ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

С.П. Туранская, В.В. Туров, П.П. Горбик

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, 03164, Киев-164*

Представлен обзор литературы по синтезу липосом для направленного транспорта лекарственных препаратов в опухолевые клетки. Использование определенной комбинации насыщенных фосфолипидов и холестерина в составе липосом приводит к повышению их стабильности. При использовании для приготовления липосом ненасыщенных фосфолипидов должны предприниматься меры для предотвращения окисления. В зависимости от молярного соотношения фосфолипидов и холестерина магнитные липосомы имеют различные размеры. Липосомы меньшего диаметра имеют преимущества перед липосомами больших размеров, поскольку они после внутривенного введения могут избегать фагоцитоза клетками ретикулоэндотелиальной системы и способны легко проникать из кровеносной системы в межклеточное пространство. Среди липосом, содержащих полиэтиленгликоль и антитела, оптимальными считаются липосомы, в которых антитела были прикреплены к дистальным концам цепей ПЭГ, связанного с липосомами. Антитела могут быть прикреплены к молекуле ПЭГ посредством тиоэфирной или амидной связи. Для получения пространственно стабилизированных липосом может использоваться растворимый в воде карбодимид.

Введение

По мере разработки и усовершенствования методик в противоопухолевой терапии все шире используются такие носители лекарственных препаратов, как липосомы – однослойные или многослойные липидные везикулы, содержащие в своем внутреннем пространстве растворенное в водной среде, либо нерастворимое, липофильное, лекарство. Липосомные мембраны обычно построены из двойного слоя молекул фосфолипидов, обращенных друг к другу неполярными «хвостами», и расположенных между ними молекул холестерина (рис. 1, 2). Липосома может содержать лекарства в одном или трех потенциальных компартментах: растворимые в воде препараты – в водной фазе, которая захватывается внутрь везикулы в процессе приготовления; липофильные препараты – в мембране; пептиды и малые белки – на границе раздела фаз липиды/вода [1].

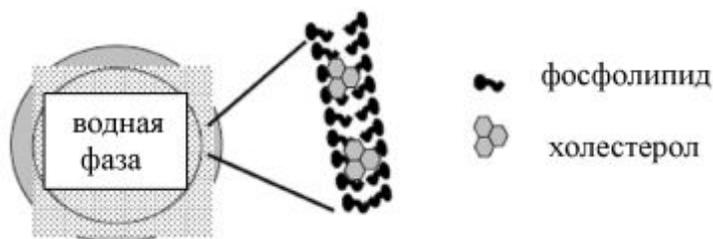


Рис. 1. Схема строения однослойной липосомы [1].

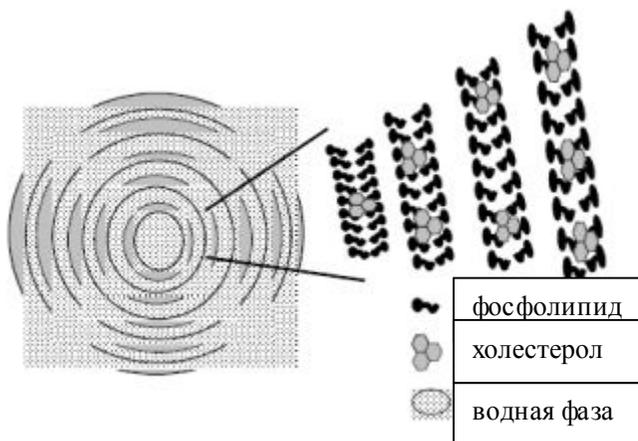


Рис. 2. Схема строения многослойной липосомы [1].

После внутривенного введения липосом они опсонизируются, т.е. связываются белками-опсонинами, распознаваемыми клетками иммунной системы, осуществляющими фагоцитоз. Таким образом происходит быстрая элиминация липосом из кровеносной системы (в течение нескольких минут) и накопление их в печени, селезенке, а также, в меньшем количестве, в костном мозге. Для увеличения времени циркуляции липосом в кровеносной системе и повышения вероятности достижения опухолевых клеток в состав липидных везикул вводят гидрофильный полимер полиэтиленгликоль либо фосфолипиды, образующие на поверхности липосом «щетину» – стерическое препятствие, не позволяющее молекулам опсонина и макрофагам (клеткам иммунной системы, осуществляющим фагоцитоз) взаимодействовать с липосомами.

Применение липосом, меченых антителами – молекулами, специфично распознаваемыми определенными рецепторами на поверхности только опухолевых клеток, позволяет вводить лекарство только в клетки-мишени, что значительно уменьшает сильное токсическое воздействие противоопухолевых препаратов на организм. Поскольку на клетках не всех типов опухолей имеются рецепторы, распознаваемые антителами, применяются приемы направленного транспорта лекарственных препаратов к опухолевым клеткам, связанные с:

- прикреплением к липосомам лигандов, распознаваемых определенными участками поверхности опухолевых клеток (олигосахаридов, витаминов, пептидов, белков);
- включением в состав липосом холестерина, химически модифицированного лигандами для специфического связывания с определенными органами или типами клеток;
- включением в состав липосом парамагнитных наночастиц, приводимых в движение при наложении статического магнитного поля, для подведения липосом непосредственно к больному органу.

Эти приемы позволяют обеспечить направленный транспорт препарата к клеткам-мишеням и, таким образом, существенно снизить побочное действие противоопухолевой терапии. После связывания лигандов, прикрепленных на поверхности липосом, с определенными участками поверхности клеток-мишеней (опухолевых клеток), происходит слияние липидных везикул – липосом с двойной липопротеидной мембраной клетки и проникновение содержимого липосом в клетку. Присутствие в липосомах парамагнитных наночастиц позволяет производить селективный нагрев клеток-мишеней при поглощении энергии переменного магнитного поля, приводящий к их гибели.

1. Состав и стабильность липосом

Липосомы получают из чистых липидов или их комбинации. Обычный компонент липосом – фосфолипиды. Липосомы синтезируют из множества синтетических и натуральных фосфолипидов, и обычно включают в их состав холестерол [1].

Для направленного транспорта лекарственных препаратов и селективного воздействия на опухолевые клетки были приготовлены термочувствительные липосомы с использованием синтетических липидов, таких как дипальмитоил-фосфатидилхолин, дистеароил-фосфатидилхолин и холестерол, способные к локальному высвобождению лекарства в ответ на гипертермию. Термочувствительные липосомы были приготовлены с применением натуральных липидов, яичного фосфатидилхолина и холестерола (в молярном соотношении 7 : 1), и этанола (6 % по объему). Эти липосомы имеют температуру перехода 43 °С, в температурном диапазоне, достижимом при локальной гипертермической обработке опухолей. Преимущества липосом фосфатидилхолин:холестерол – способность к биodeградации, нетоксичность, доступная цена по сравнению с липосомами, приготовленными из синтетических липидов, для использования в разнообразной терапии рака [2].

В зависимости от соотношения фосфатидилхолина и холестерола полученные липосомы имели различные диаметры (рис. 3) и эффективность инкапсуляции магнитной жидкости (рис. 4).

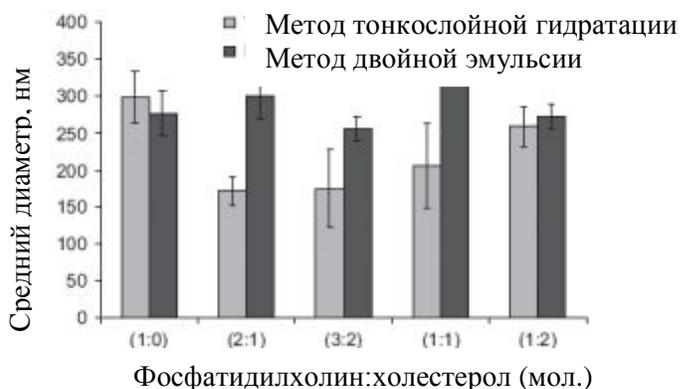


Рис. 3. Размеры магнитных липосом, полученных различными методами [3].

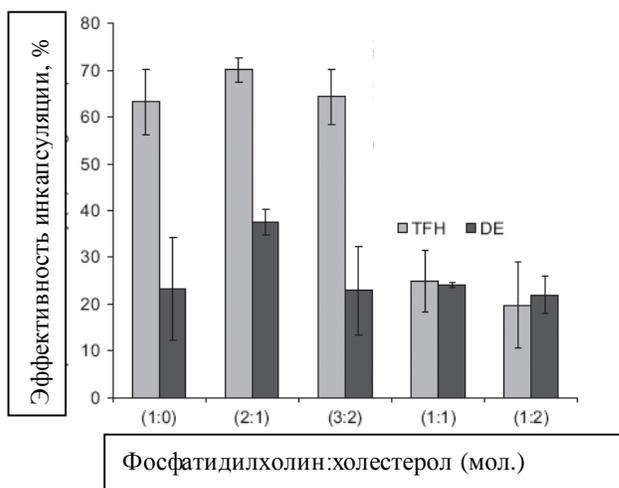


Рис. 4. Эффективность инкапсуляции липосомами магнитной жидкости. TFH – липосомы были приготовлены методом тонкослойной гидратации; DE – липосомы приготовлены методом двойной эмульсии [3].

Эффективность инкапсуляции незначительно снижалась при включении в состав липосом 5 % мол. дистеарил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоля) 2000] (рис. 5).

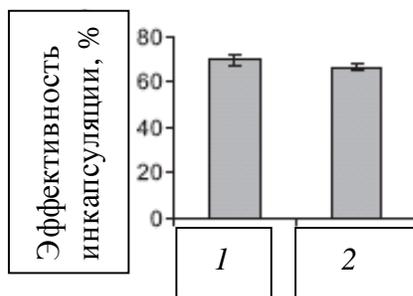


Рис. 5. Эффективность инкапсуляции магнитной жидкости липосомами, не содержащими (1) и содержащими (2) дистеарил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль) 2000] [3].

Из рис. 3 и 4 видно, что магнитные липосомы оптимального состава, имеющие наименьший диаметр и наибольшую эффективность инкапсуляции, были получены при соотношении яичного фосфатидилхолина и холестерина 2:1 с применением метода тонкопленочной гидратации. При соотношениях 1:1 и 1:2 инкапсуляция происходила с меньшей эффективностью, что может объясняться увеличением жесткости мембраны при более высоком содержании холестерина (≥ 50 % мол.). Молекулы холестерина играют важную роль в фазовом переходе фосфолипидного бислоя. Когда они присутствуют в фосфолипидном бислое, образуется третья фаза, т.е. жидкая упорядоченная фаза, вместо твердой упорядоченной или жидкой неупорядоченной фазы. Поэтому молекула холестерина, взаимодействуя с двумя молекулами фосфолипида, предотвращает их переход через гель в жидко-кристаллическую фазу. При оптимальной концентрации 33 % мол. (2:1) указанный переход не наблюдается, т.к. все фосфолипиды мембраны образуют жидкую упорядоченную фазу [3].

При определенной температуре происходит фазовый переход фосфолипидной мембраны липосом из гелеобразной фазы в жидко-кристаллическую фазу, при этом повышается проницаемость мембран для растворенных веществ и воды. В этих условиях в образцах парамагнитных термочувствительных липосом значительно увеличивается время продольной релаксации T_1 (по данным ЯМР спектроскопии), что связано с выходом парамагнитного материала из липосом и (или) увеличением скорости обмена воды между внутренним содержимым липосомы и окружающей средой [4].

Исследовали выход лекарственного препарата из липосом, приготовленных из смеси синтетических липидов, таких как дипальмитоилфосфатидилхолин и дистеароилфосфатидилхолин, у которых температура фазового перехода гель-золь на несколько градусов выше физиологической температуры. Максимальный выход препарата из липосом, у которых температура фазового перехода $41,4$ °C, наблюдали при 42 °C (83 %) и менее 5 % – при температурах ниже 37 °C (рис. 6) [5].

Выход препарата из липосом при физиологической температуре (37 °C) и температуре фазового перехода образующих липосому липидов (около 42 °C) исследовали также в работе [6] (рис. 7).

Включение холестерина в липидную бислойную мембрану обычно приводит к повышению стабильности липосом в сыворотке, уменьшению проницаемости мембран к растворимым в воде молекулам и повышению текучести или микровязкости бислоя. Наиболее часто используются для приготовления липосом такие фосфолипиды, как яичный фосфати-

дихолин, синтетические дипальмитоил-DL- α -фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин, фосфатидилинозитол. Обычно в качестве основного липида для приготовления липосом используется цвиттер-ионный или неионный липид. Поверхностный заряд липосомы можно модифицировать включением в состав положительно заряженных липидов, таких как стеариламин, или отрицательно заряженных, таких как диацетилфосфат, фосфатидилглицерол, фосфатидилсерин. Присутствие отрицательно или положительно заряженных липидов приводит к увеличению общего объема водной фазы во внутреннем пространстве липосомы (в результате отталкивания соседних бислоев) и уменьшению вероятности агрегации липосом после их приготовления. Катионные липосомы могут иметь цитолитическую и цитотоксическую активность. Катионные липосомы, содержащие стеариламин, были токсичными для кроликов, поскольку вызывали гемолиз эритроцитов. Этот эффект был непосредственно связан с количеством стеариламина, присутствующего в составе липосом.

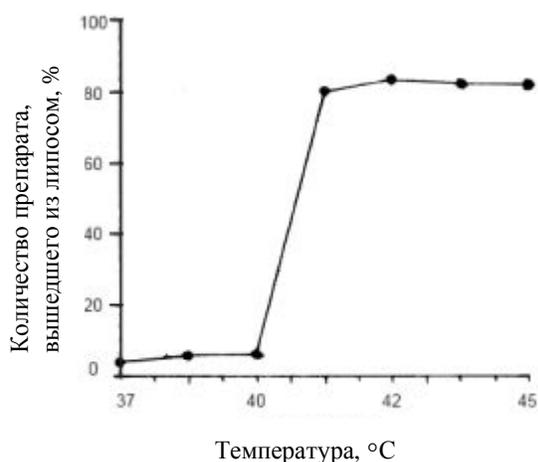


Рис. 6. Выход лекарственного препарата из липосом при повышении температуры [5].

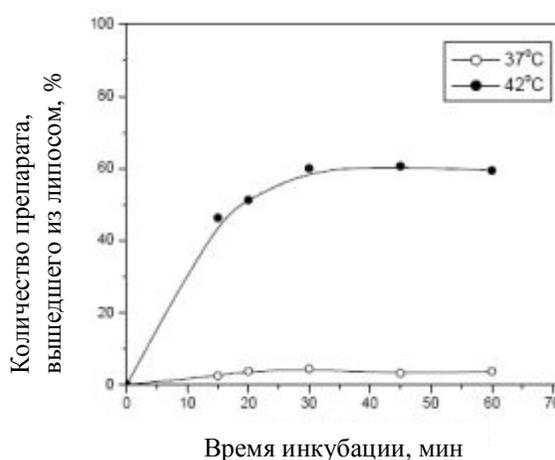


Рис. 7. Выход лекарственного препарата из липосом при повышении температуры [6].

Поскольку лекарственные препараты имеют ограниченную растворимость, количество лекарства, растворимого в воде, во внутреннем пространстве липосомы, зависит от объема захваченной внутри липосомы водной фазы. Крупные молекулы (например, пептиды и белки) лучше удерживаются внутри липосом, чем молекулы меньшего размера, которые могут медленно диффундировать сквозь липидные слои.

Эффективность включения липофильных препаратов в липидные слои липосомы может достигать 100 %, в зависимости от типа и состава липосом. При помещении липосом в водное биологическое окружение гидрофобные лекарства хорошо удерживаются в липосомах благодаря их высоким коэффициентам разделения липид-вода.

Утечка растворителя из липосом зависит от проницаемости мембран и от взаимодействия с компонентами биологических жидкостей. Для уменьшения утечки растворителя можно контролировать текучесть мембран включением в состав липидного бислоя холестерина, или изменяя гидрофобно-липофобный характер бислоев, например, при использовании фторированного липида. Многомембранные везикулы менее склонны к утечке, чем одномембранные. С целью уменьшения утечек липосомы хранят в виде высушенных после замораживания порошков.

Липидные везикулы могут подвергаться химической деградации. Гидролитическая деградация липидов или лекарственных препаратов во многих случаях зависит от pH и может быть предотвращена высушиванием (в замороженном виде) липосом до получения порошков. При использовании для приготовления липосом ненасыщенных фосфолипидов, должны предприниматься следующие меры для уменьшения окисления: использование светонепроницаемых контейнеров, применение антиоксидантов, таких как α -токоферол, деаэрация с применением аргона или азота для максимального уменьшения контакта с кислородом, удаление тяжелых металлов из среды [1].

2. Методы приготовления липосом

К настоящему времени многие сотни лекарств, включая противоопухолевые и противомикробные препараты, хелатирующие агенты, пептидные гормоны, ферменты, другие белки, вакцины и генетический материал, были включены в водные или липидные фазы липосом различного размера, состава и др. характеристиками с применением всевозрастающего количества методик. Липосомы прошли эволюцию от простых экспериментальных инструментов до индустриально производимых продуктов для клинического и ветеринарного использования. Этот успех зависит от усовершенствованных методик, позволяющих производить эффективную инкапсуляцию лекарственных препаратов и получать высокую стабильность продуктов. Конвекционный метод и усовершенствованные методики, основанные на применении этого метода, обсуждаются ниже [1].

В Институте химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины изучалась возможность получения магнитолипосом различными способами из модифицированных высокодисперсных порошков железа (ВДПЖ), проводилось изучение морфологии полученных препаратов и исследование проницаемости мембраны магнитолипосом.

Для сравнительного изучения физико-химических характеристик магнитолипосом, а именно, степени связывания ВДПЖ с липосомами различного химического состава и их устойчивости, были использованы методики встряхивания-перемешивания, озвучивания, упаривания в «обращенной фазе».

Для исследования влияния заряда липосомальной мембраны на физико-химические характеристики магнитолипосом были исследованы следующие составы фосфолипидных смесей: лецитиновые (нейтральные), лецитин-стеариламиновые (положительный заряд липосомальной мембраны) и лецитин-дидецилфосфатные (отрицательный заряд). Количественное соотношение липосомального липида и модифицированного ВДПЖ составило 3 и 25 мг, соответственно.

Для отделения полученных магнитолипосом от несвязавшегося ВДПЖ и радиоактивного маркера водной полости (14-C-инсулина) использовали метод гель-фильтрации на колонках с Сефакрилом S-1000. Для отделения $^{22}\text{Na}^+$, не включившегося в водную полость липосом, использовали метод разделения на колонках с СМ-сефадексом G-25. Как альтернативный метод отделения магнитолипосом использовали метод центрифугирования образцов при 6000 об. в течение 10 – 15 мин.

Для количественного определения липосомированного ВДПЖ использовалась колориметрическая методика определения ионов железа по интенсивности окрашивания комплекса железа с о-фенантролином. Определение проводилось по калибровочному графику, построенному по стандартным растворам железа, содержащим и не содержащим липид (0.0 – 7,5 мг липида в пробе).

Определение включения радиоактивных маркеров в магнитолипосомы осуществляли методом радиометрирования.

Получены данные по влиянию модифицирования поверхности ВДПЖ на степень связывания с липосомальными препаратами, изготовленными методом упаривания в «обращенной фазе». Достоверно не установлено различий по влиянию модифицирования поверхности ВДПЖ (олеиновой кислотой и γ -АПТЭС) на связывание с липосомами, мембрана которых сформирована из лецитин-стеариламина. Аналогичные данные получены и для чистых лецитиновых липосом. Для липосом, сформированных из лецитин-дицетилфосфата, отмечено увеличение степени связывания в 3,75 - 4,0 раза для обеих поверхностей.

Таким образом, для получения магнитолипосом, ассоциированных с ВДПЖ, представляется целесообразным вводить в состав липосомальной мембраны зарядоформеры (лецитин-стеариламин, лецитин-дицетилфосфат и др.). Целесообразно применять метод упаривания в «обращенной фазе» как наиболее эффективный. В качестве метода отделения несвязавшегося ВДПЖ рекомендуется использовать метод мягкого центрифугирования. Липосомы, полученные методом упаривания в «обращенной фазе», позволяют увеличить включение высокомолекулярного радиоактивного маркера 14-С-инсулина в водную полость магнитолипосом в 6,9 – 7,4 раза, по сравнению с методом встряхивания – перемешивания.

Перед липосомированием препарат ВДПЖ должен быть в виде коллоида с размером частиц не более 50 нм, стабилизированного от последующего агрегирования, а также от возможного химического взаимодействия с липидом мембран. Стабилизация поверхности ВДПЖ различными модификаторами не оказывает существенного влияния на степень связывания с липосомами. Препараты ВДПЖ, ассоциированные с липосомами, практически не оказывают влияния на проницаемость липосомальной мембраны для высокомолекулярных радиомаркеров (14-С-инсулин) и увеличивают скорость выхода низкомолекулярного радиомаркера ($^{22}\text{Na}^+$). При электронномикроскопическом исследовании включение одиночных частиц ВДПЖ внутрь водной полости липосом практически не выявляется.

2.1. Конвекционный метод

Конвекционный метод был впервые описан авторами [7] для приготовления многослойных везикул. Согласно этому методу, фосфолипиды растворяются в органическом растворителе (обычно в смеси хлороформ/метанол) и откладываются из растворителей в виде тонкой пленки на стенках круглодонной колбы при использовании роторного испарителя, в условиях пониженного давления. Многослойные везикулы спонтанно формируются при добавлении к высушенной липидной пленке избыточного объема водного буфера, содержащего лекарство. Содержащие лекарство липосомы можно отделить от несодержащих центрифугированием или гель-фильтрацией. Количество водного буфера (или раствора лекарства), заключенного во внутренних компартментах многослойных везикул, определяется временем гидратации высушенной пленки и условиями перемешивания. Например, сообщалось [8], что большее количество водной фазы может захватываться в случае, когда липид гидратируется в течение 20 ч при слабом перемешивании, по сравнению со временем гидратации 2 ч, при сильном встряхивании колбы, хотя распределение многослойных везикул по размеру не зависело от этих процедур.

2.2. Звуковой метод

Этот метод, используемый для приготовления малых однослойных везикул [9], включает последующую звуковую обработку многослойных везикул, приготовленных конвекционным методом. Принцип звуковой обработки состоит в использовании пульсирующих звуковых волн высокой частоты. При такой обработке суспензии многослойных везикул происходит их разрыв с образованием однослойных везикул диаметром 15 – 50 нм.

Таким образом, цель звуковой обработки заключается в получении гомогенной дисперсии малых везикул, способных к проникновению в ткань.

Основной недостаток приготовления липосом с использованием звуковой обработки – окисление ненасыщенных связей в цепях остатков жирных кислот фосфолипидов и гидролиз фосфолипидов с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот. Другой недостаток – денатурация или инактивация некоторых термочувствительных веществ (например, ДНК, некоторых белков и др.), включаемых в липосомы [1].

2.3. Экструзионный метод высокого давления

Согласно этому методу, суспензии многослойных везикул, приготовленных конвекционным методом, повторно пропускаются через фильтры – поликарбонатные мембраны с очень малым диаметром пор (0,8-1,0 мкм) под высоким давлением [8]. Подбирая фильтры с подходящим размером пор, можно получить липосомы желаемых диаметров. При продавливании многослойных липосом сквозь малые поры снимаются последовательные слои мембран, и остается только один слой. Кроме уменьшения размера липосом, экструзионный метод позволяет получить липосомы с гомогенным распределением по размеру. С применением этого метода может использоваться большое разнообразие различных липидов для получения стабильных липосом [10, 11].

Экструзия при низких давлениях (≤ 1 МПа) возможна при низкой концентрации липидов, но наиболее часто используемые давления – около 5 МПа [12]. Метод применим только для приготовления небольших количеств липосом. Для преодоления этого недостатка был разработан экструзионный прибор, действующий при высоких давлениях – до 10,5 МПа, преимущество которого – высокий выход продукта [13].

2.4. Метод растворения и удаления детергента

Этот метод, используемый для приготовления больших одномембранных везикул [14], включает применение детергента (неионного, анионного или катионного сурфактанта) для растворения липидов. Процедура включает растворение липидов в водном растворе детергента и белков, подлежащих инкапсуляции. Детергент должен иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования, так что он легко удаляется диализом или колоночной хроматографией [15]. При удалении детергента образуются большие одномембранные везикулы диаметром 0,08 – 0,2 мкм. Этот метод оказался подходящим для инкапсуляции белков биомедицинского назначения [16].

2.5. Методика испарения с обращением фаз

Методика, предложенная авторами [17], состоит в быстром введении водного раствора лекарства в органический растворитель, содержащий растворенные липиды, при одновременной звуковой обработке смеси, что приводит к образованию капель воды в органическом растворителе (эмульсии типа «вода в масле»). Полученная эмульсия высушивается до полутвердого геля в роторном испарителе. Далее, гель подвергается сильному механическому воздействию до получения фазового изменения из дисперсии «вода в масле» в «масло в воде» (т.е. водную суспензию везикул). В ходе механического воздействия некоторые капли воды образуют внешнюю фазу, в то время как другие – замкнутый внутри везикул водный объем. Таким образом получают большие однослойные везикулы диаметром 0,1 – 1 мкм. Этот метод используется для инкапсуляции как малых молекул, так и макромолекул (РНК и различные ферменты, без потери активности) [1, 17].

Липосомы, полученные методом испарения с обращением фаз, имеют большой объем захватываемой водной среды и большую эффективность инкапсуляции гидрофильных лекарств, по сравнению с липосомами, полученными гидратацией тонкой пленки с последующей звуковой обработкой [5].

В некоторых случаях метод может иметь ограничение: выдержка материала, подлежащего инкапсуляции, в органических растворителях, а также механическая обработка, может привести к денатурации некоторых белков или разрыву цепей ДНК [1].

3. Лиганды для направленного транспорта липосом в клетки-мишени

Для направленной доставки липосом к определенным органам или клеткам-мишеням в состав таких липосом в процессе их приготовления вводили химически модифицированный холестерол, к которому был присоединен лиганд для распознавания и взаимодействия с определенным органом или типом клеток. Таким лигандом может быть длинноцепочечная жирная кислота, аминокислота, олигосахарид, гормон, производное аминокислоты, белок, гликопротеид, модифицированный белок и т.п. Полученные таким образом липосомы, содержащие цитотоксический или терапевтический препарат, или молекулы генетического материала, после введения в организм быстро накапливаются преимущественно в определенных органах. Такие липосомы могут быть одно- или многослойными, их можно получать из любых липидов, обычно используемых для приготовления липосом, звуковой обработкой суспензии липидов, гидратацией кристаллизованных липидов или с применением любой другой обычной процедуры. Полученные липосомы обычно имеют размеры между 0,001 и 10 мкм. Для модифицирования холестерола используется гидроксильная группа в 3 позиции молекулы холестерола, потому что эта группа расположена на внешней стороне поверхности липидного бислоя. Модифицированный холестерол добавляется к липидам в процессе приготовления липосом, обычно в концентрации между 0,1 и 5 % мол. общего содержания липидов, предпочтительно между приблизительно 1,0 и 3,0 % мол [18].

Были разработаны долгоциркулирующие препараты липосом, содержащих определенные лиганды (“stealth”-липосомы), стерически стабилизированные липидными производными полиэтиленгликоля, применение которых повышает вероятность взаимодействия с мишенью при достижении определенной популяции клеток *in vivo*. Такими лигандами могут быть олигосахариды, витамины, пептиды, белки, в том числе молекулы антител.

4. Мечение липосом антителами

4.1. Прикрепление антител через тиоэфирную связь

Способ прикрепления моноклональных антител к концу молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ, PEG) [19] состоит в использовании синтезированного для этой цели производного функционализированного по концевой группе ПЭГ, связанного с липидом, – пиридилтиопропионоиламин-ПЭГ-дистеароилфосфатидилэтаноламина (PDP-PEG-DSPE). После включения PDP-PEG-DSPE в “stealth”-липосомы и тиолиза PDP-групп, происходящего в мягких условиях, на периферии липидных пузырьков образовывались реакционно способные тиольные группы. Малеймид-производные антител могут эффективно прикрепляться к липосомам в мягких условиях, и даже при содержании функционализированного ПЭГ-липидов менее 1 % общего количества липидов. Полученные иммунолипосомы были эффективными переносчиками лекарственного средства, которое медленно высвобождалось, и находилось в кровеносной системе в течение более длительного времени, чем липосомы, не содержащие полиэтиленгликоля.

В работе [20] для получения катионных липосом в качестве главных липидных компонентов (рис. 8) использовали фосфатидилхолин из желтков куриных яиц – пальмитоилолеилфосфатидилхолин, холестерин и катионный липид DDAB – диметилдиоктадециламмоний бромид (Avanti Polar Lipids, Alabaster AL, USA). Катионный липид в составе липосом обеспечивает им эффективное связывание с отрицательно заряженными молекулами малых интерферирующих (миРНК). В качестве флуоресцентной метки для проведения цитохимического анализа культуры клеток к липосомам на стадии смешения липидных компонентов добавляли индикатор Dil (1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат; Fluka) ($\lambda_{\text{возб}} = 549$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 565$ нм).

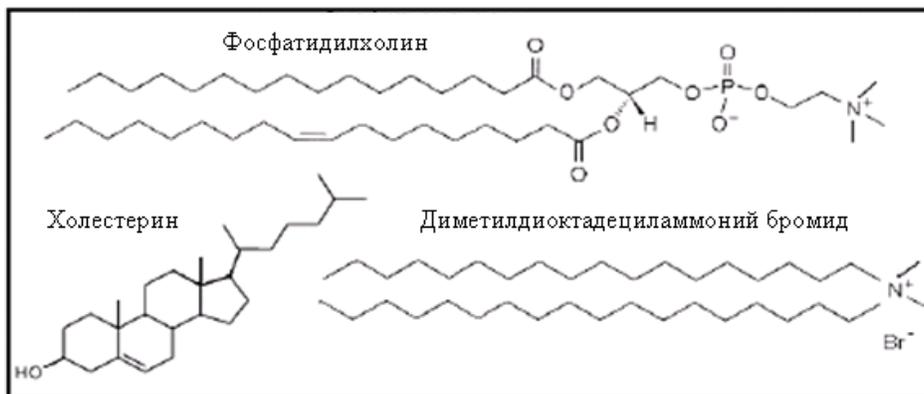


Рис. 8. Липиды, используемые для приготовления катионных липосом [20].

Для устранения основного недостатка липосом первого поколения – их быстрой элиминации из системного кровотока – в состав липосомных мембран вводили конъюгат липида с химически инертным гидрофильным полимером, DSPE-PEG – 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]. Данный липид представляет собой дистеароилфосфатидилэтаноламин, конъюгированный с ПЭГ-2000 – цепочкой полиэтиленгликоля с молекулярной массой 2000 Да, присоединенной к этаноламинной группе липида (рис. 9).

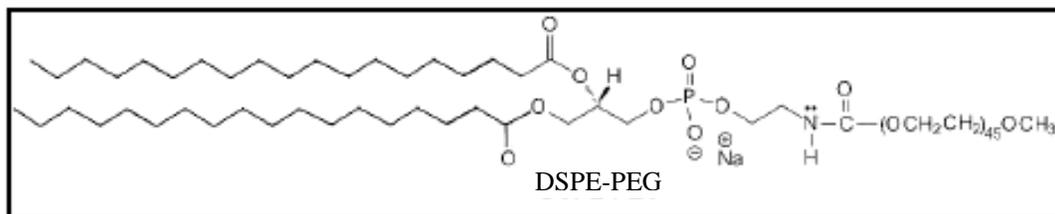


Рис. 9. Химическое строение молекулы производного липида DSPE-PEG: 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] [20].

За счет цепочек ПЭГ на внешней оболочке липосомы образовывалась как бы дополнительная “щетина”, что приводило к значительному продлению срока жизни таких стерически стабилизированных липосом в кровотоке (рис. 10) [21]. Механизм этого явления остается до конца неизученным и предполагает, что подвижные и биохимически инертные

цепочки полимера препятствуют опсонизации липосом соответствующими компонентами плазмы крови, что необходимо для последующего фагоцитоза (рис. 11).

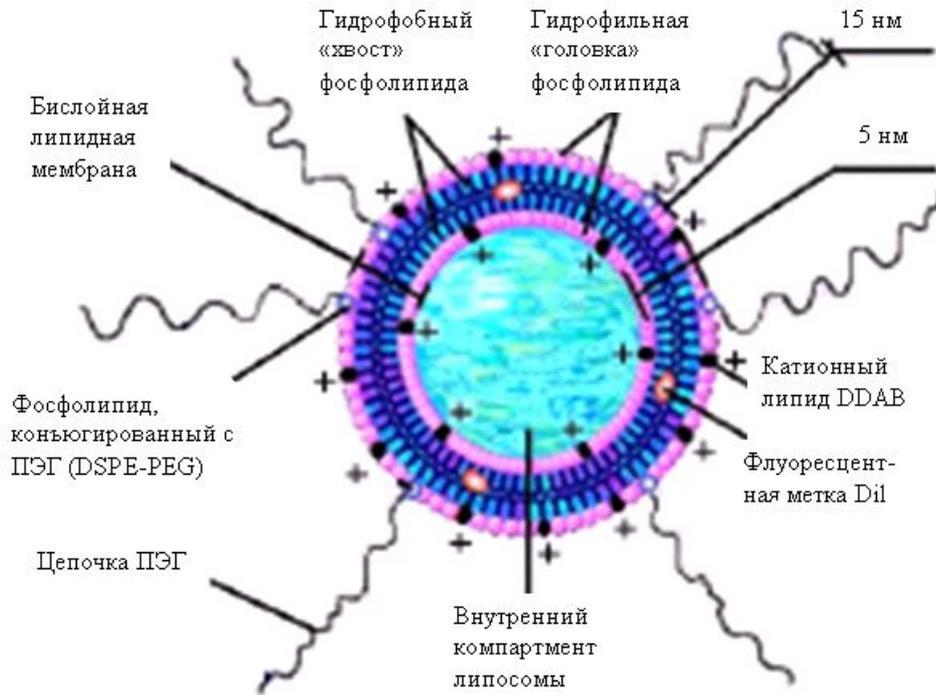


Рис. 10. Схема строения ПЭГилированной катионной липосомы [20].

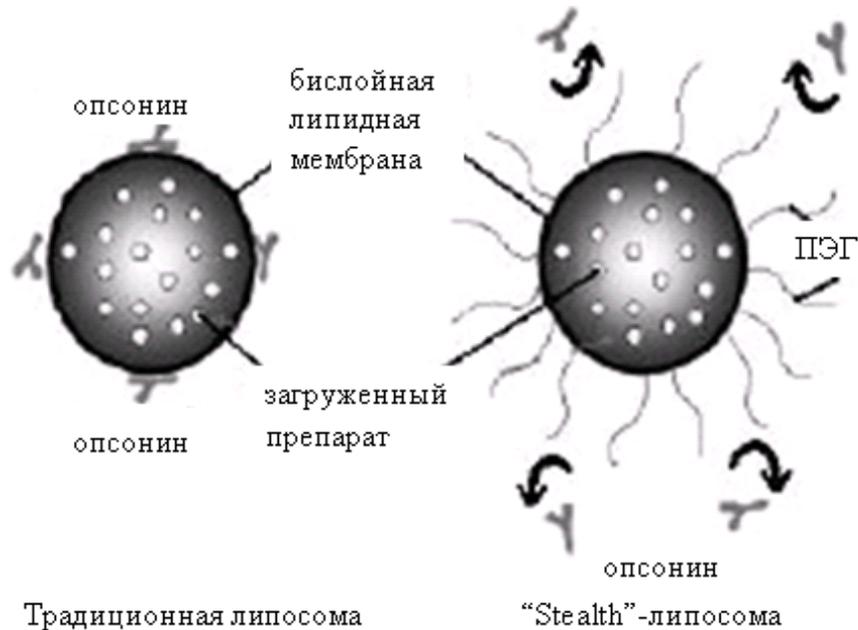


Рис. 11. Схема предупреждения процесса опсонизации за счет наличия цепочек ПЭГ у стерически стабилизированных (“stealth”) липосом [20].

Для дальнейшего конъюгирования моноклональных антител с липосомами в состав последних вводили малеимидное производное фосфатидилэтаноламина DSPE-PEG-M (1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеими́до(полиэтиленгликоль)-2000]). В его молекуле малеимидная группа присоединена к терминальному звену цепочки полиэтиленгликоля, конъюгированного с этаноламинной группой фосфолипид (рис. 12).

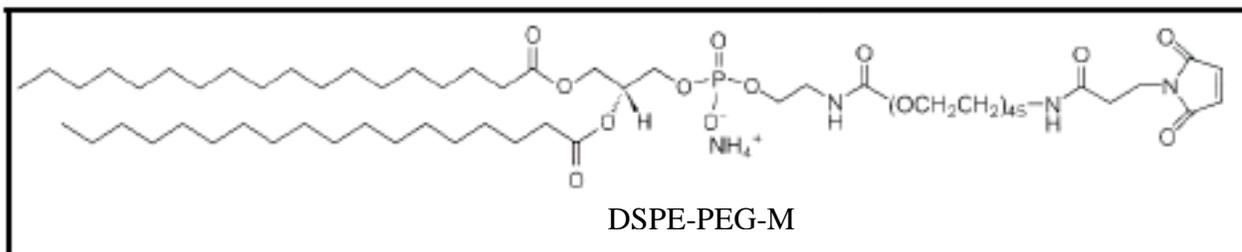


Рис. 12. Химическое строение молекулы производного липида DSPE-PEG-M: 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[малеими́до(полиэтиленгликоль)-2000] [20].

Отобранные в соответствии с расчетом количества липидных компонентов (фосфатидилхолина, холестерина, DDAB, DSPE-PEG-M, DSPE-PEG, Dil) растворяли в смеси хлороформа с метанолом (9:1) в концентрации 10-20 мг суммарных липидов в 1 мл растворителя. Эти растворы смешивали в молярном соотношении 23 : 16 : 4,4 : 1 : 1,6 : 0,4. Растворитель удаляли упариванием на роторном испарителе при пониженном давлении в атмосфере аргона. Затем смесь липидов растворяли в сухом циклогексане, замораживали в жидком азоте и лиофилизовали. Все манипуляции по приготовлению липосом (за исключением кратковременных – взвешивание и т.п.) осуществляли в атмосфере аргона высокой чистоты.

Для загрузки в липосомы нуклеиновых кислот (миРНК длиной 21 пар нуклеотидов) за основу была выбрана методика N. Shi (2000) [22]. Модифицирование заключалось в том, что загрузка миРНК проводилась на стадии эмульгирования липидной пленки. Обработка ультразвуком и серия циклов замораживания – оттаивания исключались за ненадобностью. Таким образом, модифицированная методика оказалась менее трудоемкой и адекватно обеспечивала выполнение поставленных задач.

Полученный липоплекс пропускали через поликарбонатные фильтры (Nucleopore) с размерами пор 400, 200, 100 и 50 нм с помощью ручного мини-экструдера (Avanti) для получения липосом определенного размера (рис. 13). После этого эмульсию липосом можно разбавлять до необходимых концентраций, подвергать мягкому химическому модифицированию, операциям гель-фильтрации, центрифугирования и т.п.

Количество связавшихся с липосомами миРНК определяли люминесцентным методом следующим образом: полученный препарат липосом, загруженных миРНК, подвергали ультрафильтрации через конические поликарбонатные мембраны с порогом отсека 50 кДа (CentriFlo, Amicon, Голландия) при центрифугировании в течение 1 ч при 3000 об/мин. В ультрафильтрате определяли количество РНК с помощью коммерческой системы Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen, США) и флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Результаты показали, что в ультрафильтрате РНК обнаружено не было (предел чувствительности данной флуориметрической системы 20 нг/мл), т.е. все молекулы миРНК связались с липосомами.



Рис. 13. Схема загрузки миРНК в липосомы на этапе эмульгирования липидной пленки [20].

Конъюгацию липосом с векторным белком (моноклональными антителами) проводили малеимидным способом в соответствии со стандартной методикой [23]. Сохранность иммунокомпетентности антител на всех этапах тиолирования и конъюгации тестировали методом иммуногистохимии на срезах мозга крыс.

Малеимидная группа DSPE-PEG-M, входящего в состав полученных липосом, способна связываться со свободной сульфгидрильной группой белка, образуя прочный тиоэфирный конъюгат. По этой причине молекулы белка перед конъюгацией с липосомами необходимо тиолировать, т.е. ввести в них дополнительные свободные сульфгидрильные группы. Для этого моноклональные антитела (МАТ) подвергали взаимодействию с 2-иминотиололаном (реактив Траута), который реагировал со свободными первичными аминогруппами белка, например, с ϵ -аминогруппами остатков лизина, присоединяя к ним SH-содержащий радикал (рис. 14). Реакцию проводили в атмосфере инертного газа, чтобы избежать окисления введенных сульфгидрильных групп и побочных реакций неспецифического конъюгирования. Антитела инкубировали с 20-кратным молярным избытком тиолирующего агента. Отделение продукта реакции проводили гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G25. Контроль за движением препарата осуществляли фотометрическим детектором при $\lambda = 280$ нм.

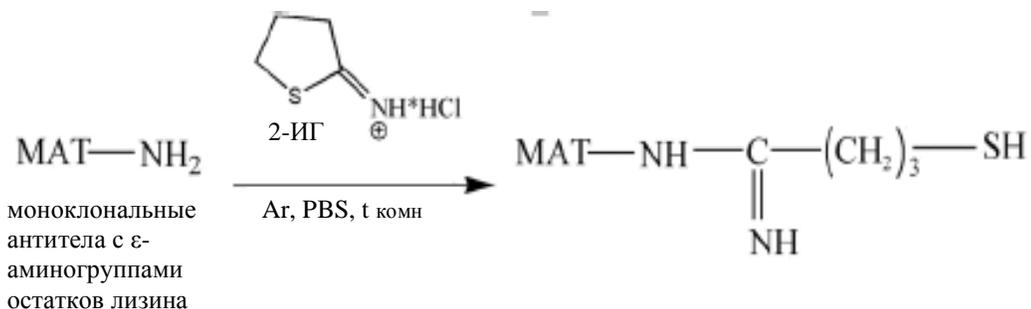


Рис. 14. Реакция тиолирования антител реактивом Траута [20].

Для конъюгирования с векторным белком свежеприготовленные липосомы инкубировали 12 ч со свежетиолированными антителами в темноте при слабом перемешивании в атмосфере инертного газа (рис. 15).

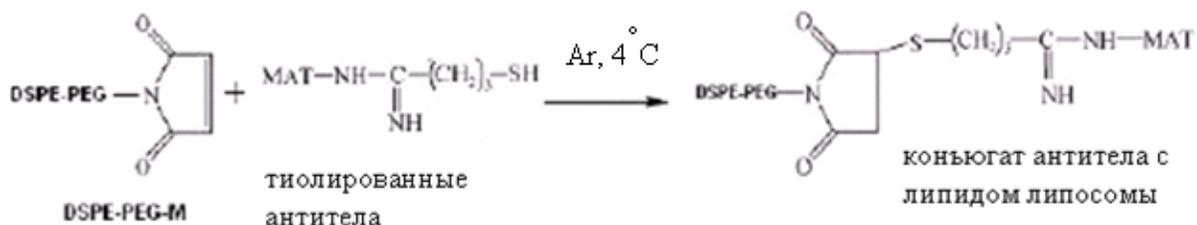


Рис. 15. Реакция конъюгирования малеимидного производного липида липосомы с тиолированным моноклональным антителом [20].

Реакцию останавливали введением 100-кратного молярного избытка (по отношению к белку) N-этилмалеимида, который блокировал оставшиеся несвязанными сульфгидрильные группы. После этого целевые иммунолипосомы отделяли от остальных компонентов реакционной смеси гель-фильтрацией на колонке с сефарозой CL-4В. Контроль за движением образца осуществляли визуально по окраске Dil. В результате был получен препарат в виде эмульсии, содержащий иммунолипосомы размером 100 нм, загруженные миРНК (рис. 16).

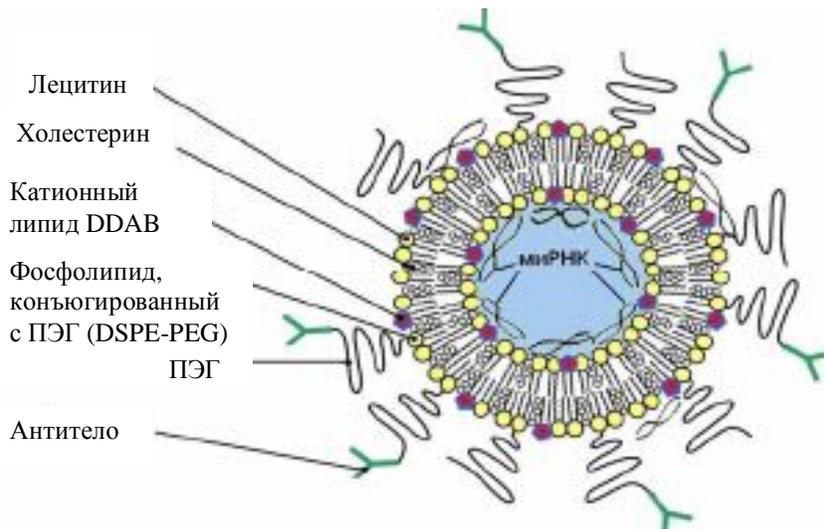


Рис. 16. Схема строения иммунолипосомы, загруженной миРНК [20].

Методом динамического светорассеяния на гониометре, оборудованном He-Ne лазером (Photocor Instruments), проводили измерение гидродинамических радиусов не векторных катионных липосом и иммунолипосом, конъюгированных с векторными антителами. Флуктуации интенсивности света регистрировали с помощью 288-канального коррелятора Photocor FC. Для обработки полученных данных использовали программное обеспечение Dyna LS. Величины гидродинамических радиусов рассчитывали с использованием уравнения Стокса в приближении для сферических частиц [20].

Среди разнообразных лигандов, используемых для конъюгации молекул антител с липосомами, эффективность двух из них – N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата (SPDP) и N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата (SATA) – исследовалась в работе [24]. Моноклональные антитела, модифицированные SPDP и SATA, через тиозфирные связи образовывали конъюгаты с липосомами, функционализированными различными липофиль-

ными соединениями малеимида, такими как метиловый эфир N-(3-малеимидопропионил)-N²-пальмитоил-L-лизина (MP-PL), N-(3-малеимидопропионил)фосфатидилэтаноламид (MP-PE), метиловый эфир N⁶-(6-малеимидакапроил)-N²-пальмитоил-L-лизина (EMC-PL) и N-(6-малеимидакапроил)-фосфатидилэтаноламин (EMC-PE). Состав матричных липидов для приготовления липосом был следующим: соевый фосфатидилхолин/холестерол/DL- α -токоферол в соотношении 1:0,2:0,01 мольных долей при начальной концентрации фосфатидилхолина 20 мг/мл. Производные малеимида MP-PL, MP-PE, EMC-PL и EMC-PE добавлялись в концентрациях 0,02 – 0,05 мольных долей, и цитостатический препарат арабинозид N⁴-олеилцитозина – 0,2 мольных долей. Для включения в липосомные мембраны использовался липофильный флуоресцентный краситель N,N'-бис-(1-гексилгептил)-3,4:9,10-перилебис(дикарбоксимид) в концентрации 0,006 мольных долей. В некоторых случаях липосомы были мечены прибавлением следовых количеств 1,2-дипальмитоил-L-3-фосфатидил[N-метил-³H]холина или включением в состав используемых компонентов 0,003 мольных долей липофильного хелатирующего агента моностеарата диэтилентриаминпентауксусной кислоты, с которыми радиоактивные ионы марганца (⁵⁴Mn²⁺) образовывали комплексное соединение после формирования липосом. Органические растворители удаляли на роторном испарителе.

Препараты липосом фильтровали через стерильные фильтры с размером пор 0,45 мкм (Sartorius) и хранили при 4 °С. Размер и гомогенность липосом определяли методами рассеивания лазерных лучей и электронной микроскопии с негативным контрастированием и получением поверхности излома образца.

Концентрации реакционноспособных малеимидных групп, расположенных на внешней поверхности липосом, определяли реакцией с избытком цистеина, после чего непрореагировавший цистеин определяли реактивом Элмана.

Липосомы, содержащие 0,02 мольных долей производных малеимида MP-PL, MP-PE, EMC-PL и EMC-PE, имели средний диаметр 50 нм и при хранении при 4 °С были физически устойчивы в течение более 60 дней. При содержании 0,05 мольных долей производных малеимида липосомы были сравнительно устойчивы, исключая MP-PL содержащие липосомы, которые образовывали осадок вскоре после приготовления. Для всех типов функционализированных липосом наблюдалось снижение их связывающей активности при хранении.

Антитела метили N-сукцинимидил[2,3-³H]пропионатом (³H-NSP). Проводили реакцию растворов антител (1 мг/мл) в борате натрия (0,1 М)/HCl (0,1 М), NaCl (0,5 М), pH 0,5 с ³H-NSP, который добавляли в молярном избытке 50 %, в течение 1 ч при 0 °С. Непровзаимодействовавшие молекулы ³H-NSP удаляли в процессе диализа против 1000-кратных объемов 67 мМ фосфатного буфера.

К раствору антител (10 – 40 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере/0,1 М NaCl, pH 7,5 медленно добавляли при комнатной температуре раствор SPDP (150 мМ) в этаноле, до молярного соотношения антител к SPDP 1:24, 1:12 или 1:6. Реакцию проводили в течение 60 мин, затем смесь подвергали диализу против двух 1000-кратных объемов фосфатного буфера при 4 °С более 24 ч для удаления непрореагировавших молекул SPDP. После диализа модифицированные SPDP антитела хранили при 4 °С. Для определения количества связавшихся с антителами молекул SPDP в аликвотах восстанавливали дисульфидные связи при добавлении раствора дитиотрейтола, затем измеряли адсорбцию 2-тиопиридона при 343 нм.

Растворы модифицированных SPDP антител подвергали диализу против ацетатного буфера (0,1 М ацетат натрия/0,1 М уксусная кислота, 0,1 М NaCl, pH 4,5) при 4 °С более 24 ч. Добавляли дитиотрейтол до конечной концентрации 25 мМ, проводили инкубацию при 25 °С в течение 60 мин. Затем реакционную смесь фракционировали при комнатной температуре на колонке Sephadex G-50 (30×1 см) при использовании 67 мМ фосфатного буфера (pH 6,0). При скорости течения 0,5-1 мл/мин активированные антитела (AT-P-SH) отделялись от дитиотрейтола и 2-тиопиридона. Конъюгацию с малеимид-содержащими липосомами производили при 25 °С сразу после отделения активированных антител на колонке, в соотношениях AT-P-SH к малеимиду в липосомах 1:10, 1:20 и 1:40. Концентрации антител варьировали между 0,15 и 0,6 мг/мл, концентрации липидов (фосфатидилхолина) – 1 – 5 мг/мл. Конъюгацию осуществляли в атмосфере азота при умеренном перемешивании через различные промежутки времени. Для остановки реакции добавляли N-этилмалеимид, растворенный в минимальном объеме 67 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), в 24-кратном избытке по отношению к концентрации антител.

Проводили реакцию взаимодействия антител с SATA, в течение 60 мин при 25 °С, в атмосфере азота, при слабом перемешивании (концентрация антител – 4 – 10 мг/мл (0,25 – 1·10⁻⁹ М) в 50 мМ фосфатном буфере/1 мМ EDTA (pH 7,5), концентрация SATA – 150 мМ; сначала SATA был растворен в минимальном объеме диметилформамида). Молярные соотношения антител к SATA составляли 1:24, 1:12 и 1:6. Непровзаимодействовавшие молекулы SATA отделяли диализом при 4 °С против 1000-кратного объема того же буфера более 24 ч.

Для измерения количеств модифицированных SATA антител, аликвоты деацетилировали гидроксиламином, после чего определяли свободные сульфгидрильные группы при использовании реактива Элмана. 1 мл раствора модифицированных SATA антител деацетилировали добавлением 0,1 мл гидроксиламина·HCl (0,5 М в 50 мМ фосфатном буфере /25 мМ EDTA, pH 7,5) в течение 60 мин при 25 °С, в атмосфере азота, при перемешивании. Конъюгацию активированных антител (AT-A-SH) с малеимид-содержащими липосомами производили немедленно после деацетилирования при pH 6,0 и молярных соотношениях AT-A-SH (взятых в концентрации 0,3 мг/мл) к малеимид-содержащим молекулам в составе липосом 1:10, 1:20 и 1:40, при 25 °С. Через 0,2 – 20 ч реакцию останавливали N-этилмалеимидом в молярном соотношении 1:24.

Преимущество использования SATA по сравнению с SPDP – в отсутствии потребности использовать восстанавливающий агент, такой как дитиотрейтол, для активации тиольных групп. Остающиеся следовые количества восстанавливающего агента уменьшают эффективность реакции конъюгации. Активация SATA производится гидроксиламином, что имеет дополнительное преимущество – повышает стабильность свободных тиольных групп. Антитела, модифицированные SPDP, формировали осадок при восстановлении дитиотрейтолом при pH 4,5. Антитела, модифицированные SATA, не выпадали в осадок при активации.

Конъюгация через SPDP происходила наиболее эффективно при соотношении этих молекул к антителам 24:1 – 20 – 25 % через 1 – 4 ч инкубации. При использовании SATA в качестве сшивающего агента, более высокие активности были получены при более низких соотношениях SATA:антитело – при соотношении 6:1 степень связывания составляла 20 %, при соотношении 12:1 – 60 – 65 %, при инкубации 2 – 4 ч. Инкубация в течение более 4 ч не приводила к повышению эффективности конъюгации. Эффективность связывания антител

B8-24.3 была максимальной при pH 6 (62 % через 2 ч инкубации) и снижалась при pH 5 (48 %) и 4 (34 %).

Непровзаимодействующие, активированные антитела отделяли от иммунолипосом методом флотации на прерывистом градиенте метризамидом. Раствор иммунолипосом с антителами смешивали в нитроцеллюлозной ультрацентрифужной пробирке (объемом 5 мл) с 60 %-ным метризамидом до конечной концентрации метризамидом 20 %, покрывали 2 мл 10 %-ного метризамидом, затем 0,5 мл 67 мМ фосфатного буфера (pH 7,4) – верхний слой. Градиент плотности центрифугировали в течение 12 – 16 ч при 95000 g при 4 °C в ультрацентрифуге L8-9M (Beckman). Всплывшие иммунолипосомы, видимые как розовая флуоресцентная полоса, тщательно отбирали от нижележащих фаз метризамидом, после чего дважды проводили диализ против 400 мл 67 мМ фосфатного буфера (pH 7,4) для удаления обратимо связанного метризамидом [24].

Стабильные липосомы отделяли от промежуточных продуктов реакции при использовании непрерывного градиента сахарозы (5 – 20 %, 30 мл) и сахарозной подушки (65 %, 3,5 мл). Суспензию перед загрузкой на градиент нагревали при 43 °C 20 мин. Максимальная вместимость загрузки составляла 35 мг в 1 мл буфера. Препаративные градиенты сахарозы центрифугировали при $2,5 \times 10^4$ об/мин в течение 16 ч. Липосомы собирали на границе раздела буфер / 5 % сахароза и диализовали против фосфатного буфера при pH 8,0 в течение 8 ч [25].

4.2. Взаимодействие с образованием амидной связи

Карбодиимиды – агенты поперечного связывания, которые могут спонтанно реагировать с белками с образованием поперечных связей между аминокислотными боковыми цепями. Общая формула карбодиимидов – $R_1-N=C=N-R_2$, где R_1 и R_2 – любая химическая группа, при условии, что она не содержит сильный нуклеофил. Карбодиимиды имеют очень высокую реакционную способность, и присутствие нуклеофильной группы в R_1 или R_2 приведет к внутри- и межмолекулярным реакциям молекул карбодиимидов. R_1 и R_2 независимо выбираются из любых разветвленных или с прямой цепью, насыщенных или ненасыщенных, алкильных, алкенильных, арильных, аларкильных, аларкенильных групп или их вариантов с галогенными, третичными аминными, эфирными, кетонными или другими заместителями. Одна или обе R_1 , R_2 могут содержать дополнительную карбодиимидную группу, например как поликарбодиимид.

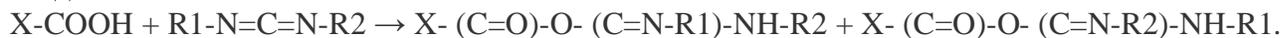
Предпочтительно, выбираются карбодиимиды водорастворимые, однако суспензия тщательно диспергированного нерастворимого в воде карбодиимидом, такого как диметиламинопропилкарбодиимид, может также использоваться в реакции поперечного связывания альбумина и других белков. При варьировании групп R_1 , R_2 изменяется растворимость, иммуногенность и токсичность карбодиимидом, как и способность взаимодействовать с молекулами альбумина. Могут быть выбраны R-группы, содержащие дополнительные фотоактивируемые группы.

Может использоваться также водорастворимый карбодиимид, присоединенный к полиэтиленгликолю, общая формула которого – $R_1O-PEG-R_2-N=C=N-R_3-PEG-OR_4$, где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 независимо выбираются, как описано выше. Например, это могут быть –NCO (изоцианаты), приводящие к образованию бифункционального ПЭГ и поли(ПЭГ-карбодиимидом). R_2 и R_3 могут также содержать расщепляемые в процессе гидролиза или ферментативных реакций группы, так что связанный поперечными цепями продукт реакции при их расщеплении будет подвергаться биодеградации.

Основанный на полиэтиленгликоле карбодиимид синтезируется в реакции алкокси-ПЭГ-изоцианатов в присутствии подходящего катализатора:



Карбодиимиды образуют поперечные связи между молекулами альбумина, взаимодействие происходит при pH между 5 и 7. Свободная карбоксильная группа молекулы альбумина (–COOH-конца или боковой цепи остатков глутаминовой или аспарагиновой кислоты) атакует молекулу карбодиимида, что приводит к образованию промежуточных соединений:



Далее, свободная аминогруппа той же или другой молекулы альбумина (–NH₂-конца или боковой цепи остатков лизина или аргинина) атакует одно из этих промежуточных соединений, что приводит к образованию поперечно-связанного альбумина [26].

Для получения магнитных частиц, конъюгированных с антителами и содержащих полиэтиленгликоль, использовали производное полиэтиленгликоля с карбоксильными группами α,ω -дикарбоксиполиэтиленгликоль. Карбоксильные группы активировали с применением карбодиимида: к раствору 5 г (2,5 ммоль) α,ω -дикарбоксиполиэтиленгликоля (со средним молекулярным весом 4000) и 288 мг (2,5 ммоль) N-гидроксисукцинимид в 15 мл диметилформамида добавляли 1 мл диметилформамида, содержащего 618 мг дициклогексилкарбодиимида.

К производному полиэтиленгликоля с активированными карбоксильными группами (600 мг) прибавляли 10 мл водного раствора (фосфатный буфер, pH 7,0), содержащего антитела к аспарагиназе, полученные из кроликов, иммунизированных аспарагиназой. Реакцию проводили при 25 °С в течение 90 мин, и получали конъюгат полиэтиленгликоль-антитело.

pH раствора 1 г полиэтиленгликоль-антитело в 1,3 мл воды доводили до 8,0 водным раствором аммония, затем к нему прибавляли 0,6 мл водного раствора, содержащего 64 мг хлорида железа (II) и 151 мг хлорида железа (III). Прибавляя раствор по каплям, pH поддерживали между 8,0 – 8,5 водным раствором аммония, и смесь тщательно перемешивали, при комнатной температуре. После диализа реакционной смеси против воды, конъюгат магнитный материал-антитело получали при лиофилизации.

Этот конъюгат, содержащий 34 % магнитного материала и 25 % белка, диспергировали в водных растворах и органических растворителях, таких как бензол, толуол, хлороформ, хлорированные углеводороды, и полностью получали из этих растворов при наложении магнитного поля ~6000 эрстед в течение 5 мин.

Конъюгат магнитный материал-антитело в водном растворе и органических растворителях не осаждался центрифугированием при 2000 g, и его мутность не изменялась в течение 24 – 60 ч в измерениях при 600 нм. Таким образом, конъюгат обладал высокой дисперсионной стабильностью. Методом электронной микроскопии было установлено, что конъюгат состоит из частиц размером 10 – 40 нм.

Конъюгат магнитный материал-антитело имел высокое сродство к аспарагиназе и активность 70 % по сравнению с антителами к аспарагиназе, не образующими конъюгат с магнитным материалом [27].

Реакция с карбодиимидом может использоваться для конъюгации белков, таких как антитело или антиген, с поверхностью оксида железа, содержащей карбоксильные группы цитрата [28]. В водных средах оксиды железа содержат незанятые атомные орбитали, которые могут участвовать в образовании координационной связи на поверхности с гидроксил-ионами воды. Координационная связь на поверхности оксида железа с цитрат-

ионами образуется за счет разделения единственной электронной пары кислорода карбоксильных групп цитрата. Взаимодействие белков с поверхностью оксида железа осуществлялось ковалентным связыванием через аминокруппы с гидроксильными группами поверхности, посредством либо амидной связи, в случае цитратных лигандов, либо эфирной связи, в случае гидроксильных лигандов. Конъюгацию производили при использовании водорастворимого 1-этил-3-диметил-карбодиимида, при pH 5, в буферной среде (NaCl, MES, PBS, HCl в диапазоне концентраций 20-100 мМ). Реакцию проводили при следующих концентрациях компонентов: 2 мг/мл феррожидкости, 5 г/л белка (поликлональные IgG антитела), 5 мг/мл карбодиимида в буфере, в результате получали стабильный реагент на основе частиц оксида железа, активный в иммунных реакциях агглютинации. Предварительное активирование феррожидкости карбодиимидом в течение 2 ч при комнатной температуре перед инкубацией с антителами в течение 12 ч приводило к повышению иммунной активности продукта, что связано с уменьшением поперечного связывания в сравнении со случаем, когда все компоненты смешиваются одновременно. После инкубации необходимы четыре последовательных разделения центрифугированием и отмывки при оптимальном составе дисперсионной среды для удаления нежелательных продуктов реакции и получения коллоидного устойчивого реагента в виде частиц, способного к иммуноагглютинации. Оптимизация состава среды производится для каждого антитела, поскольку они имеют, например, различные изоэлектрические точки. Желательно использовать полиэтиленгликоль, оптимально ПЭГ 6000 в концентрации 0,001 % вес/объем. ПЭГ способствует коллоидной устойчивости частиц в течение длительного времени, повышая их плавучесть в суспензии, и ускорению преципитации в реакции иммуноагглютинации, действуя по механизму стерического исключения. Другие полимеры, такие как маннитол, глицерол и декстраны, также могут использоваться для повышения гомогенности частиц.

Описанные условия были применимы в случаях феррожидкостей, в которых лигандами выступали и цитрат-, и гидроксил-ионы.

В качестве координируемых лигандов выбирают, предпочтительно, производные цитрата, но могут также использоваться производные сукцината, глутарата, тартрата, азалата, ЭДТА, ЭГТА, или гидроксил-ионы.

Для достижения поверхностной координации цитрата, феррожидкость центрифугировали при 2500 об/мин 10 мин, и половину супернатанта удаляли и заменяли 25 мМ раствором лимонной кислоты. После ресуспендирования образцы подвергали кратковременному встряхиванию. Эта же процедура применима при использовании других карбоксильных кислот, перечисленных выше. Смесь оставляли при слабом перемешивании на 12 ч, при комнатной температуре. Избыток цитрата удаляли в процессе повторной отмывки водой и центрифугированием (четыре раза, при 20000 об/мин в течение 20 мин, при комнатной температуре). Конечный состав среды для конъюгации – 50 мМ фосфат натрия/ 0,9 % NaCl, pH 5 (PBS).

После диализа 20 мл антител в 500 мл 50 мМ PBS в течение 12 ч, антитела центрифугировали при 2500 об/мин 5 мин, отбирали надосадочную жидкость. Концентрацию белка измеряли методом спектрофотометрии, при 280 нм, в 10 аликвотах при разведении в буфере 1:50. Конъюгацию производили при инкубации 5,85 мл PBS, 1,5 мл феррожидкости (после взаимодействия с цитратом, 1 мг/мл) и 150 ультрал 1-этил-3-диметил-карбодиимида (5 мг/мл) при 30 °С в течение 2 ч. Реагент на основе частиц оксида железа центрифугировали со скоростью 20000 об/мин 20 мин при комнатной температуре, промывали дважды в буфере PBS и ресуспендировали в 3 мл среды, состоящей из 1,1 мл

антител и 1,5 мл PBS с добавлением поверхностно-активного агента Gafac (0,04 %), затем проводили инкубацию 12 ч при комнатной температуре.

Полученную смесь промывали три раза раствором 0,2 М глицин/ 0,9 % NaCl (GBS), содержащим бычий сывороточный альбумин (1 %) и азид натрия (0,004 %), pH 7,5, и ресуспендировали двухкратной звуковой обработкой по 15 с интенсивностью 20 и на ледяной бане с перерывом между импульсами 1 мин. Раствор, готовый для использования, хранили при 4 °С. Аликвоту надосадочной жидкости после первого центрифугирования отбирали для измерения концентрации белка, так что количество присоединенных к феррожидкости частиц может быть рассчитано вычитанием из начального количества.

Контроль агглютинации проводили при 340 нм, согласно закону рассеяния света для частиц размером < 70 нм [28].

5. Магнитные липосомы

Магнитолипосомы для гипертермической обработки опухолевых клеток были приготовлены покрытием частиц магнетита фосфолипидом. Оптимальным для достижения хорошей диспергируемости был следующий состав фосфолипида: соотношение фосфатидилхолина к фосфатидилэтаноламину 2:1. Средний размер магнитолипосом, сердцевиной которых были агрегаты частиц магнетита размером 10 нм, составлял 80 нм. Магнитолипосомы покрывали гидразид-пуллуланом для стабилизации фосфолипидных капсул и обеспечения адсорбции антител. С применением этого метода, на одной частице (магнитолипосоме) были иммобилизованы 90-180 молекул моноклональных антител. При инкубации липосом, конъюгировавших с антителами, с опухолевыми клетками, они адсорбировались на клеточной поверхности и проникали в клетки в 12 раз более эффективно, чем в контроле, в течение 4 ч. Количество проникшего магнетита – 0,61 – 3,6 пг/клетку, в зависимости от системы антиген-антитело [29].

В литературе описаны различные методы приготовления магнитных липосом. Способ приготовления магнитных катионных липосом для гипертермической обработки опухолевых клеток описан в [30]. Могут использоваться любые магнитные наночастицы, такие как железо, кобальт, никель и их соединения, в частности магнетит, диаметром от 10 до 70 нм, предпочтительно около 40 нм.

Наночастицы покрывали катионным фосфолипидом; в некоторых случаях, катионные липосомы с прикрепленными антителами, специфичными к определенным опухолевым клеткам, фиксировали на поверхности покрытых карбоксиметилцеллюлозой магнитных наночастиц; или магнитные наночастицы диспергировали в растворе карбоксиметилцеллюлозы; или использовали кристаллы магнитных наночастиц игольчатой формы.

Катионные липосомы в [30] представляют собой магнитные наночастицы, например магнетита, покрытые двойными мембранами фосфолипида, содержащими катионный липид. В качестве фосфолипида предпочтительно использовать глицерофосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, дифосфатидилглицерол, фосфатидную кислоту и т.д., и сфинголипид, такой как сфингомиелин и др., это может быть единственный липид или смесь, в частности, фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилглицерол предпочтительны, их можно использовать отдельно или приготовить смесь. В качестве катионного липида можно использовать липид с углеродным номером 10-18, в частности, N-(альфа-триметиламмоний-ацетил)-дидодецил-О-глутамат.

Соотношение фосфолипида и катионного липида составляет от 10:1 до 1:1, предпочтительно от 4:1 до 3:1. Толщина двойных фосфолипидных мембран – от 5 до 40 нм, предпочтительно около 10 нм.

Катионный липид готовили следующим образом. Раствор вышеупомянутой смеси липидов в хлороформе помещали в яйцеобразную колбу, затем хлороформ испаряли в ротационном приборе при давлении ниже атмосферного, при этом смесь липидов испаряется до получения внутри колбы пленки. Далее, магнитные наночастицы в виде коллоидных частиц добавляли в колбу в подходящем количестве, и содержимое подвергали ультразвуковой обработке. В соответствии с этой методикой получают катионный липид, содержащий магнетит в виде магнитных наночастиц, называемый магнетит-содержащей катионной липосомой.

Покрытые карбоксиметилцеллюлозой магнитные наночастицы готовили, как описано ниже. Магнитные наночастицы в количестве от 0,1 до 1,5 г, предпочтительно 0,3 г, помещали в прибор для перемешивания, добавляли дистиллированную воду до объема 10 мл и нагревали в ячейке термостата при 6 °С, затем добавляли от 10 до 30 мл (предпочтительно 20 мл) 6%-ного раствора карбоксиметилцеллюлозы. После перемешивания полученной смеси в течение 30 мин производили обработку ультразвуком (15 мин). Получали покрытые карбоксиметилцеллюлозой магнитные наночастицы.

Композиты магнитных наночастиц игольчатой формы готовили так. Магнитные наночастицы и карбоксиметилцеллюлозу растворяли в воде в весовом соотношении от 4:1 до 15:1, предпочтительно 8:1, и перемешивали в течение 90 мин. Композиты игольчатой формы формировали при использовании экструзионного прибора с диаметром от 0,1 до 2,0 мм и подходящей длиной, предпочтительно в соответствии с размером опухоли, предпочтительна упаковка с размером 80 мм. После просушивания на воздухе в течение 2-х дней производили горячую сушку при вращении в интервале 80 – 100 °С, и продукт был готов.

Гипертермию опухоли с применением магнетит-содержащих катионных липосом (МКЛ) производили следующим образом. Приготовленные МКЛ вводили в опухолевый очаг либо непосредственно, либо внутрь артерии или вены, после чего МКЛ специфически адсорбируются опухолевой тканью. При наложении магнитного поля происходит селективное поглощение тепла и гибель клеток, адсорбированных МКЛ [30].

Метод тонкопленочной гидратации, который оказался более эффективным для инкапсулирования водной магнитной жидкости, содержащей наночастицы покрытого лауриновой кислотой феррита марганца $MnFe_2O_4$, чем метод двойной эмульсии, описан в [31]. 5 различных молярных соотношений (1:0, 1:1, 1:2, 2:1, 3:2) яичного фосфатидилхолина и холестерина использовали для приготовления магнитных липосом. Нужно количество фосфатидилхолина и холестерина растворяли в смеси хлороформ/метанол в объемном соотношении 2:1 в круглодонной колбе. Затем растворитель испаряли в вакууме при комнатной температуре в ротационном испарителе для формирования тонкой липидной пленки. В колбу добавляли магнитную жидкость и проводили гидратацию в течение 30 мин при 40 °С. Образец подвергали звуковой обработке (20 кГц, 250 Вт) 15 мин для образования одномембранных магнитных липосом. К образцам добавляли 0,9 % раствор NaCl в объемном соотношении 1:1 для осаждения неинкапсулированных магнитных наночастиц. Только неинкапсулированные частицы осаждаются таким раствором благодаря ионным взаимодействиям. Затем проводили центрифугирование при 1000 г 10 мин при 4 °С. Отбирали супернатант и хранили образцы при 2 – 4 °С.

Согласно методу двойной эмульсии [32], нужные количества яичного фосфатидилхолина и холестерина растворяли в смеси хлороформ/метанол (2:1, по объему), затем добавляли магнитную жидкость. Производили звуковую обработку в течение 15 мин, получая первичную эмульсию. К первичной эмульсии медленно добавляли деионизированную воду, и смесь снова подвергали звуковой обработке в течение 15 мин. Таким образом, получали вторичную эмульсию. Растворитель удаляли из раствора на роторном испарителе под вакуумом при комнатной температуре. Для отделения неинкапсулированных магнитных наночастиц производили те же процедуры, что и при получении липосом методом тонкопленочной гидратации.

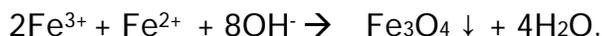
В зависимости от молярного соотношения яичного фосфатидилхолина и холестерина магнитные липосомы в полученных образцах [31] имели различные значения средних гидродинамических диаметров. Липосомы меньшего диаметра имеют преимущества перед липосомами больших размеров, поскольку они могут избегать фагоцитоза клетками ретикулоэндотелиальной системы и способны легко проникать в межклеточное пространство.

Магнитные липосомы оптимального состава (полученные методом тонкопленочной гидратации при соотношении яичного фосфатидилхолина и холестерина 2:1) были выбраны на основе их наименьшего размера (средний диаметр 170 нм) и наибольшей эффективности инкапсуляции. Меньшая эффективность инкапсуляции при соотношениях 1:1 и 1:2 может объясняться увеличением жесткости мембраны при более высоком содержании холестерина (≥ 50 % мол.). При оптимальной концентрации 33 % мол. (2:1) все фосфолипиды мембраны образуют жидкую упорядоченную фазу.

Долгоциркулирующие липосомы получали включением 5 % мол. дистеарил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоля) 2000] в бислой магнитных липосом, полученных методом тонкопленочной гидратации при соотношении яичного фосфатидилхолина и холестерина 2:1. Эти липосомы могут использоваться для гипертермической обработки раковых опухолей. Более того, в дальнейшем они могут быть использованы для целенаправленной термо-химиотерапии опухолей [31].

Схема метода приготовления магнитных липосом, разработанная в [33] представлена на рис. 17.

Согласно схеме, сначала синтезируются наночастицы Fe_3O_4 путем совместного осаждения ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} в щелочной среде:



Реакция проводится в присутствии цитрат-ионов, которые при адсорбции на ядрах оксидов железа ингибируют рост наночастиц и обеспечивают отрицательные электрические заряды на их поверхности, что препятствует агрегации [34]. После добавления соевых фосфолипидов и димиристоилфосфатидилхолина смесь подвергали звуковой обработке при pH 7,5 в атмосфере азота при 25 °C в течение 20 мин. Полученные однослойные везикулы отделяли от компонентов, не включившихся в их состав, диализом и гель-фильтрацией. Оксид железа осаждается внутри липосом, образуя внутреннюю оболочку, в процессе прохождения протонов сквозь мембрану после добавления основания (трис, NaOH) до pH 10-13. Осаждение Fe_3O_4 происходит при pH между 9 и 14, однако при pH ниже 10,5 осаждение оксидгидроксида не было полным, а при pH выше 12 липосомы разрывались. Первичный оксид превращали в магнитную смесь нагреванием до 90 °C, после чего производили несколько раз отмывку и центрифугирование, при pH 7,5, первоначально в буфере борат-KCl (1 M). Формирование липосом и внутренней структуры оксида железа в буфере трис-KCl (1 M)

наблюдали с применением развернутого по времени нейтронного рассеивания. Размер везикул оценивали методом динамического светорассеяния. Электронно-микроскопическое изображение липосом показано на рис. 18 [33].

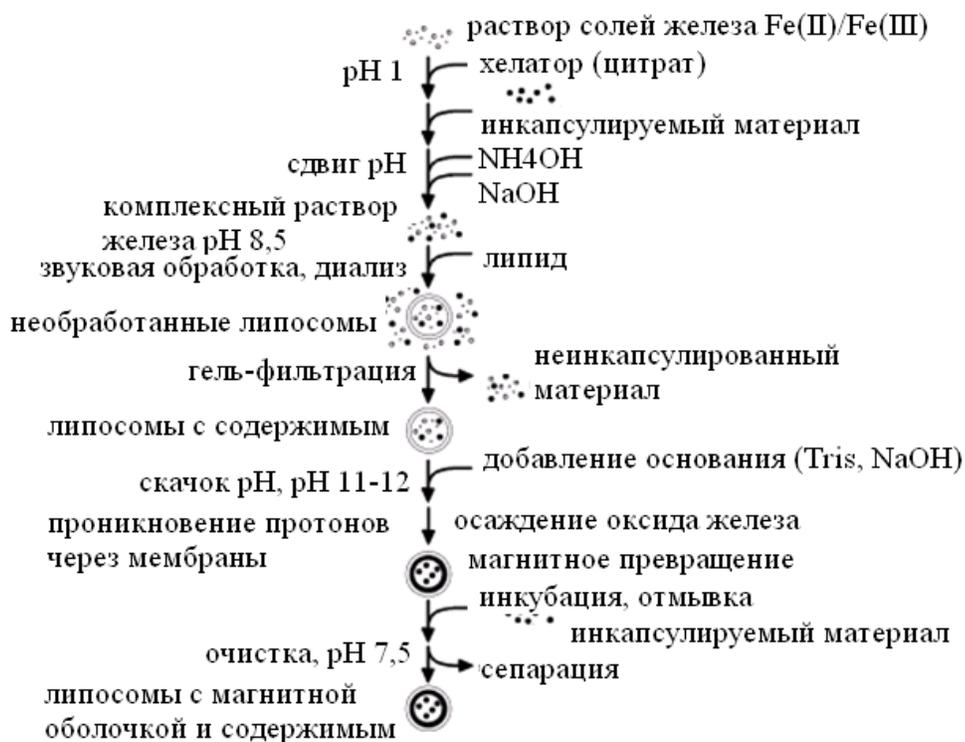


Рис. 17. Схема получения магнитных липосом, содержащих лекарственный препарат [33].

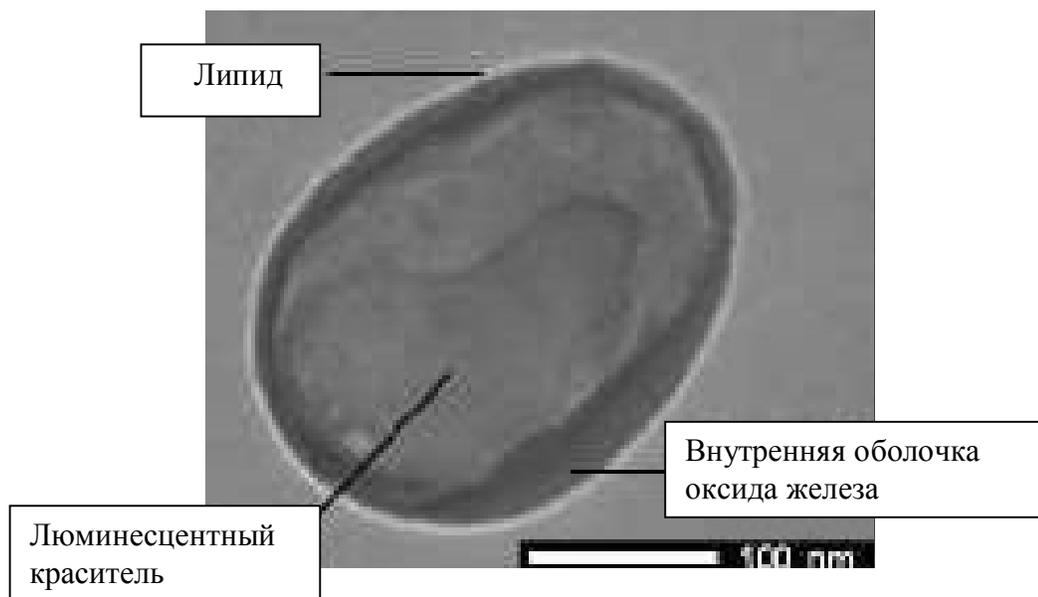


Рис. 18. Электронно-микроскопическое изображение липосом, полученных из фосфатидилхолина сои. Толщина внутренней оболочки оксида железа около 6 нм [33].

Для получения магнитных липосом авторы [35] сначала готовили однослойные везикулы диаметром около 30 нм звуковой обработкой раствора фосфолипидов в смеси $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (в объемном соотношении 9:1), испарением органических растворителей и гидратацией образовавшейся липидной пленки в соответствующем буфере. Звуковая обработка проводилась в течение 10 мин; далее сосуд охлаждали до температуры выше фазового перехода гель – жидко-кристаллическая фаза используемых фосфолипидов. Магнитные липосомы были приготовлены смешиванием избытка полученных везикул с раствором феррожидкости, стабилизированной лауриновой кислотой (при весовом соотношении фосфолипида к Fe_3O_4 5:1), после этого проводили диализ.

Заключение

Подбирая состав и метод приготовления липосом, можно варьировать их размеры и объем захватываемой водной среды, эффективно инкапсулировать лекарственные препараты с целью направленной доставки в органы- или клетки мишени. Состав среды оптимизируется с учетом физико-химических свойств инкапсулируемых веществ и присоединяемых к липосомам молекул. Прикрепление к липосомам антител приводит к усилению их захвата фагоцитирующими клетками ретикулоэндотелиальной системы. Для уменьшения захвата липосом иммунокомпетентными клетками везикулы защищают, например, молекулами полиэтиленгликоля.

Работа выполнена при поддержке Украинского научно-технологического центра (проект №3832).

Литература

1. Uhumwangho M.U., Okor R.S. Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review // JMBR: A Peer-review Journal of Biomedical Sciences. – 2005. – V. 4, № 1. – P. 9 – 21.
2. Chelvi T.P., Ralhan R. Designing of thermosensitive liposomes from natural lipids for multimodality cancer therapy // International journal of hyperthermia. – 1995. – V. 11, № 5. – P. 685 – 695.
3. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer / A.P. Pradhan, J. Giri, R. Banerjee, J. Bellare, D. Bahadur // J. of Magnetism and Magnetic Materials. – 2007. – V. 311. – P. 208 – 215.
4. Paramagnetic thermosensitive liposomes for MR-thermometry / L.H. Lindner, M. Schlemmer, R. Stahl, M. Peller // International Journal of Hyperthermia. – 2005. – V. 21, № 6. – P. 575 – 588.
5. Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management / B. Tiwari Sandip, N. Udupa, B.S.S. Rao, P. Uma Devi // Indian Journal of Pharmacology. – 2000. – V. 32. – P. 214 – 220.
6. Gaber M.H. Physicochemical properties of thermosensitive liposomes encapsulating fluorescein diphosphate // Romanian J. Biophys. – 2004. – V. 14, № 1 – 4. – P. 43 – 52.
7. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids // J Mol Biol. – 1965. – V. 13. – P. 238 – 252.
8. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes / F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos // Biochim Biophys Acta. – 1976. – V. 557. – P. 9 – 23.

9. Single bilayer liposomes // S.M. Johnson, A.D. Bangham, M.W. Hill, E.D. Korn // *Biochim Biophys Acta.* – 1971. – V. 233. – P. 820 – 826.
10. Nayar R., Hope M.J., Cullis P.R. Generation of large unilamellar vesicles from long-chain saturated phosphatidylcholine by extrusion techniques // *Biochim Biophys Acta.* – 1989. – V. 986. – P. 200 – 206.
11. Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterisation of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential / M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis // *Biochim Biophys Acta.* – 1985. – V. 812. – P. 55 – 65.
12. Amselem S., Gabizon A., Barenholz Y. A large-scale method for the preparation of sterile and non pyrogenic liposomal formulations of defined size distributions for clinical use. In: Gregoriadis G (Ed.). *Liposome Technology*. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press, 1993. – P. 501 – 525.
13. Generation of contrast-carrying liposomes of defined size with a new continuous high pressure extrusion method / T. Schneider, A. Sacfse, G. Robling, M. Brandl // *Int J Pharm* 1995. – V. 119. – P. 1 – 12.
14. Brunner J., Skrabai P., Hauser H. Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physicochemical properties // *BiochimBiophys Acta.* – 1976. – V. 455. – P. 322 – 331.
15. Weiner N., Martin F., Riox M. Liposomes as drug delivery system // *Drug Dev Ind Pharm.* – 1989. – V. 15, № 10. – P. 1523 – 1554.
16. Frezard F. Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines // *Braz J Biol Res.* – 1999. – V. 32, № 2. – P. 181 – 189.
17. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase // *Proceeding to the National Academy of Sciences.* – 1978. – V. 75. – P. 4194 – 4198.
18. Liposomes containing modified cholesterol for organ targeting. United States Patent 4544545 (1985).
19. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells / T.M. Allen, E. Brandeis, C.B. Hansen, G.Y. Kao, S. Zalipsky // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1995. – V. 1237, № 2. – P. 99 – 108.
20. Цибулькина Е.А. Иммунолипосомальные системы направленного транспорта малых интерферирующих РНК в клетки-мишени // *Автореферат дис. канд. хим. наук.* – М., 2008.
21. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. Liposomes revisited // *Science.* – 1995. – V. 267. – P. 1275 – 1276.
22. Shi N., Pardridge W.M. Noninvasive gene targeting to the brain // *PNAS.* – 2000. – V. 97, № 13. – P. 7567 – 7572.
23. Studies on protein–liposome coupling using novel thiol-reactive coupling lipids: influence of spacer length and polarity / M. Fleiner, P. Benzinger, T. Fichert, U. Massing // *Bioconjugate Chem.* – 2001. – V. 12, № 4. P. 470 – 475.
24. Comparative studies of the preparation of immunoliposomes with the use of two bifunctional coupling agents and investigation of in vitro immunoliposome-target cell binding by cytofluorometry and electron microscopy / R.A. Schwendener, T. Trüb, H. Schott, H. Langhals, R.F. Barth, P. Groscurth, H. Hengartner // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1990. – V. 1026, № 1. – P. 69 – 79.
25. Sullivan S.M., Huang L. Preparation and characterization of heat-sensitive immunoliposomes // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1985. – V. 812, № 1. – P. 116 – 126.

26. (WO/1999/066964) Carbodiimide cross-linked albumin for bioadhesives, surgical sealants and implantable devices.
27. US Patent 4814098 - Magnetic material-physiologically active substance conjugate.
28. (WO/2003/031975) Homogeneous ligand binding assay.
29. Antibody-conjugated magnetoliposomes for targeting cancer cells and their application in hyperthermia / M. Shinkai, M. Suzuki, S. Iijima, T. Kobayashi // Biotechnology and applied biochemistry. – 1995. – V. 21, № 2. – P. 125– 137.
30. Immunopotentiators in thermotherapy for cancer / T. Kobayashi, M. Shinkai, H. Honda, K. Ueno, K. Ohtsuka // European Patent EP1438971, 07/21/2004.
31. Preparation and characterization of manganese ferrite-based magnetic liposomes for hyperthermia treatment of cancer / P. Pradhan, J. Giri, R. Banerjee, J. Bellare, D. Bahadur // Journal of magnetism and magnetic materials. – 2007. – V. 311. – P. 208 – 215.
32. Microencapsulation of hemoglobin in liposomes using a double emulsion, film dehydration/rehydration approach / S. Zheng, Y. Zheng, R.L. Beissinger, R. Fresco // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – V. 1196. – P. 123 – 130.
33. Nawroth T., Rusp M., May R.P. Magnetic liposomes and entrapping : time-resolved neutron scattering TR-SANS and electron microscopy // Physica B. – 2004. – V. 350. – P. 635 – 638.
34. Synthesis and characterization of ultrafine well-dispersed magnetic nanoparticles / Z.L. Liu, H.B. Wang, Q.H. Lu, G.H. Du, L. Peng, Y.Q. Du, S.M. Zhang, K.L. Yao // J. Magn. Magn. Mater. – 2004. – V. 283. – P. 258 – 262.
35. Attachment of water-soluble proteins to the surface of (magnetizable) phospholipid colloids via neutravidin-derivatized phospholipids / M. De Cuyper, M. Hodenius, Z.G.M. Lacava, R.B. Azevedo, M. de Fátima da Silva, P. Cesar Morais, M. Helena Andrade Santana // J. Colloid and Interface Sci. – 2002. – V. 245. – P. 274 – 280.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЛИПОСОМ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

С.П. Туранская, В.В. Туров, П.П. Горбик

*Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str. 17, 03164, Kyiv-164*

The review is presents the results of the synthesis of liposomes for the targeted drug delivery into the tumor cells. The usage of the definite combination of saturated phospholipids and cholesterol leads to their stability increasing. On using unsaturated phospholipids for liposome preparation one could undertake precautions to minimize oxidation. Depending on the molar ratio of phospholipids and cholesterol, the size of magnetic liposomes is different. The liposomes of lesser diameter are preferable to larger ones because of their ability to escape phagocytosis by the cells of reticuloendothelial system and permeate from the bloodstream into the interstice easily. Among the liposomes, containing polyethylene glycol and antibodies, the most optimal ones are those, which contain the antibodies attached to distal edges of polyethylene glycol molecule chains. The antibody may be attached to polyethylene glycol molecule with the help of thioester or amide bond. In order to obtain sterically stabilized liposomes, water soluble carbodiimide should be taken.