



УДК 577.114.7:577.352.2:616-006

## ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДНЫХ ЛИГАНДОВ НА ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ЛИПОСОМ С ДИГЛИЦЕРИДНЫМ КОНЪЮГАТОМ МЕТОТРЕКСАТА В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК ОСТРОЙ ЛЕЙКЕМИИ ЧЕЛОВЕКА

© 2009 г. Н. Р. Кузнецова, Г. П. Гаенко, С. В. Хайдуков, Н. В. Бовин, Е. Л. Водовозова<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 29.12.2008 г. Принята к печати 20.01.2009 г.

Эффективность применения химиотерапевтического цитостатического препарата метотрексата (MTX) ограничена частым развитием устойчивости опухолевых клеток. Ранее нами показано *in vitro* на примере клеток острой лейкемии человека с различной чувствительностью к MTX (Т-лимфобластоидная линия CCRF-CEM и резистентная сублиния CEM/MTX), что включение MTX в липосомы в виде липофильного пролекарства – диглицеридного конъюгата (MTX-DG) – позволяет преодолеть устойчивость клеток, связанную с нарушением активного транспорта через мембрану. В данной работе с помощью углеводных флуоресцентных зондов (конъюгатов с полиакриламидом) изучен профиль связывания с углеводами клеток указанных линий. Синтезированы липофильные конъюгаты тетрасахарида SiaLe<sup>X</sup> и 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc, а также контрольный конъюгат неактивного пентаола, предназначенные для встраивания в липосомы. Показано в культуре чувствительных клеток CCRF-CEM, что цитотоксичность MTX-DG-липосом повышается более чем в 3.5 раза при оснащении лигандом SiaLe<sup>X</sup> по сравнению с MTX-DG-липосомами с контрольным неактивным пентаолом. Активность MTX-липосом, несущих 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc, в отношении резистентных клеток CEM/MTX увеличилась более чем в 1.6 раза. Обсуждается применение углеводных лигандов в качестве молекулярных адресов для лекарственных липосом, как потенциальный метод воздействия на гетерогенную ткань опухоли.

**Ключевые слова:** метотрексат; липофильные пролекарства; липосомы; лектины; гликоконъюгаты; лейкемия; резистентность опухолевых клеток.

### ВВЕДЕНИЕ

Включение противоопухолевых препаратов в состав носителей-наночастиц, в том числе липосом размера не более 100–150 нм, позволяет уменьшить общую токсичность лекарства и повысить эффективность лечения за счет уменьшения концентрации свободного лекарства в кровотоке и обусловленного носителем пассивного транспорта в опухоли и очаги воспаления, связанного с повышенной проницаемостью дефектных стенок капилляров неоплазмы (эффект EPR, enhanced permeability and retention [1]). Разработаны липосомы, защищенные от преждевременного вывода из кровотока молекулярными клетками ретикуло-эндотелиальной

системы: так, например, поверхность Stealth<sup>®</sup>-липосом экранирована гидрофильными остатками полиэтиленгликоля (ПЭГ), ковалентно связанными с липидами бислоя [2]. Липосомы как наиболее биосовместимые носители лекарств уже применяются в клинике (например, Doxil<sup>®</sup> – липосомная форма доксорубина [3]).

Технология активной загрузки (remote loading) лекарства во внутренний объем липосом, которая используется в производстве, пригодна лишь для ограниченного класса веществ, имеющих катионную липофильную структуру, в первую очередь для антибиотиков антрациклинового ряда. Альтернативный лабораторный способ – формирование липосом в водно-солевом растворе препарата с последующим отделением от невключившегося лекарства – не технологичен. Включение лекарств (в основном, гидрофильных веществ) в форме липофильных пролекарств в мембрану липосом упрощает способ производства липосомных препаратов. Более того, липофильные пролекарства сами по себе обладают улучшенной фармакокинетикой [4]. Липосомные формы липидных производных некоторых лекарств, в том числе Ara-C [5], сарколизина [6, 7], митомицина С [8], превзошли исходные ле-

Сокращения: MTX – метотрексат; MTX-DG – диглицеридный конъюгат MTX; DHFR – дигидрофолатредуктаза; MDR – множественная лекарственная устойчивость; ABC – семейство белков АТФ-связывающих кассет; RFC – белок, транспортирующий восстановленный фолат; Sug-PAA-fluo – гликоконъюгаты с флуоресцеинметечным полиакриламидом; SiaLe<sup>X</sup> – Sialyl Lewis X, Neu5Acα2-3Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ; 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc – 6-O-HSO<sub>3</sub>-Galβ1-4GlcNAcβ; PBS – физиологический раствор, приготовленный на фосфатном буфере; PC – фосфатидилхолин; PI – фосфатидилинозит.

<sup>#</sup> Автор для связи (тел.: (495) 330-66-10; факс: (495) 330-6601; эл. почта: elvod@ibch.ru).

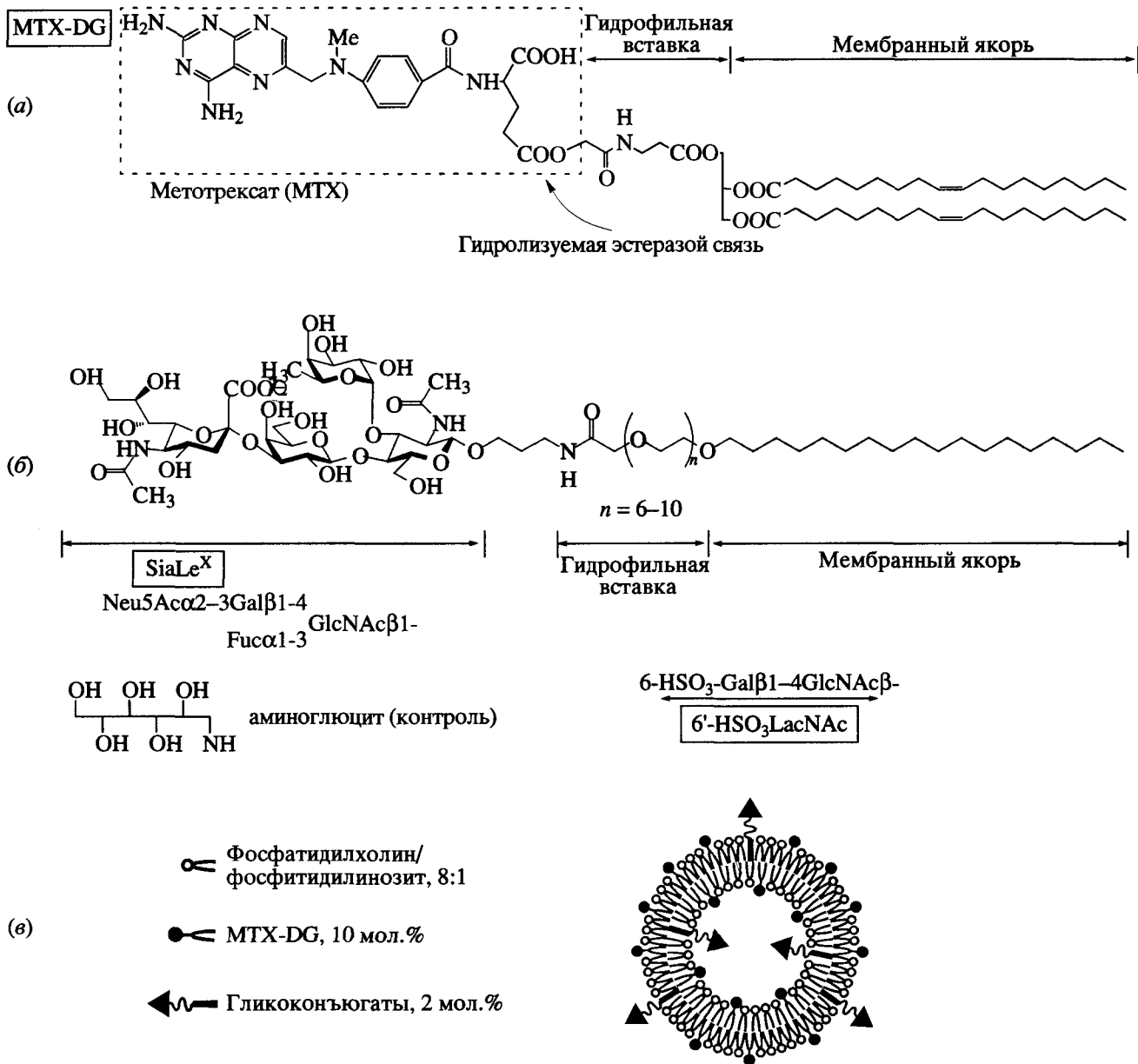


Рис. 1. Структуры конъюгата метотрексата с диглицеридом (MTX-DG) (а), липофильных гликоконъюгатов (б) и схематическое изображение адресной лекарственной липосомы (в).

карства по противоопухолевой активности на мышиных моделях опухолей, а также при клинических испытаниях [5].

Цитостатический препарат метотрексат (MTX, антимаетаболит фолиевой кислоты, рис. 1) почти 50 лет широко применяется в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий, таких, как ревматоидный артрит, где он до сих пор остается лекарством номер один [9]. MTX конкурентно ингибирует дигидрофолатредуктазу (DHFR, КФ 1.5.1.3) и лишает клетку тетрагидрофолата, необходимого кофактора биосинтеза тимидилата. Эффективность лечения MTX ограничивается не только его

системной токсичностью, но и частым развитием клеточной устойчивости (например, при острой лимфобластоидной лейкемии – до 30% случаев [10]), связанной, в основном, с нарушением его транспорта в клетку за счет мутаций белка, переносящего в клетку восстановленный фолат и аналоги-антифолаты (reduced folate carrier, RFC), и уменьшения его активности [9, 11].

Пассивный трансмембранный перенос полярной молекулы MTX затруднен. Липофильные антифолаты, лишенные Glu-остатка, такие, как триметрексат, пиритрексим, метоприн, зидовудин, способны диффундировать в клетку без участия системы

активного транспорта ([12] и цит. лит.). В свою очередь, к этим препаратам развивается устойчивость опухолевых клеток, обусловленная флипазной функцией Р-гликопротеина (Р-рр) [13]. Одним из основных механизмов развития множественной лекарственной устойчивости (MDR) является повышение продукции опухолевыми клетками белков-насосов, выводящих ксенобиотики из клеток – интегральных белков суперсемейства так называемых АТР-связывающих каскет (АТР-binding cassettes, ABC) [14], в том числе Р-рр (АВСВ1). Показано, что в развитии клеточной устойчивости к МТХ также участвуют белки семейства ABC: белки MRP1-5 (АВСС1-5) ([15] и цит. лит.) и белок резистентности рака легких ВСРР (АВСГ2) [16].

Включение лекарств в наноразмерные супрамолекулярные или полимерные системы доставки, в том числе в липосомы, позволяет преодолеть MDR, обусловленную действием Р-рр [17]. Очевидно, эффект связан с изменением механизма эндоцитоза препаратов: вместо активного или пассивного трансмембранного переноса молекул происходит пиноцитоз частиц. Можно ожидать, что применение МТХ в составе той или иной системы доставки приведет к существенному уменьшению резистентности опухолевых клеток, обусловленной как дефицитом активности RFC, так и чрезмерным функционированием белков семейства ABC. Исследуются возможности улучшения фармакологических свойств МТХ за счет включения его в полиамидные дендримеры (в виде ковалентного конъюгата) [18], микросферы из поли-*L*-лактата [19], декстран [20], желатин [21].

Нами разработан синтез конъюгата МТХ с *rac*-1,2-диолеилглицерином (МТХ-DG, рис. 1), предназначенного для включения в липосомы [22, 23]. Объемистый остаток МТХ отделен от диглицеридного якоря короткой полярной вставкой, которая в липидном бислое располагается в зоне полярных головок фосфолипидов, что позволяет меньше нарушать упаковку бислоя и включать в липосомы больше лекарства. Связь между остатком лекарства и остальной частью молекулы должна легко гидролизироваться внутри клетки-мишени. Поскольку эстеразы менее специфичны, чем пептидазы, здесь более предпочтительна сложноэфирная связь, а не амидная.

Ранее описан конъюгат МТХ с димиристоилфосфатидилэтаноламином (амидная связь по  $\gamma$ -СООН-группе МТХ) [24]; в липосомной форме он эффективно ингибировал коллаген-индуцированный артрит *in vitro* и *in vivo* [25]. Липофильная модификация глутаматных карбоксиллов МТХ, позволяющая сохранить сродство к ферменту-мишени DHFR, была предложена в качестве способа преодоления резистентности клеток, связанной с нарушением активного транспорта. Показано, что в мицеллярных формах алифатические сложные  $\gamma$ -эфирные [26] и амиды липоаминокислот [27] метотрексата были активны в культуре клеток острой Т-лимфобласто-

идной лейкемии СЕМ/МТХ, резистентных к МТХ из-за дефектного RFC.

В наших экспериментах МТХ-DG в составе липосом обнаружил цитотоксическую активность в культурах клеток меланомы М3 [23] и лейкемии СЕМ-CCRF [28, 29]; очевидно, он высвобождает МТХ за счет гидролиза внутриклеточными эстеразами, являясь пролекарством, либо непосредственно ингибирует DHFR. Кроме того, в липосомной форме МТХ-DG в существенной степени преодолел резистентность клеток СЕМ/МТХ [28, 29]. Так, цитотоксическая активность МТХ в культуре клеток СЕМ/МТХ была в 218 раз ниже, чем в культуре чувствительных клеток СЕМ-CCRF, а для липосом с МТХ-DG это отношение (показатель резистентности) уменьшилось до значений в интервале 4.9–1.9.

Активный транспорт липосом, то есть повышение селективности действия на клетки опухоли, возможен при их оснащении молекулярными адресами, имеющими повышенное сродство к злокачественным клеткам. В качестве лигандов для направленной доставки предложены моноклональные антитела или их фрагменты, фолаты и др. [30]. Один из подходов для получения адресных липосом основан на явлении повышенной экспрессии опухолевыми клетками лектинов – специфических углеводсвязывающих белков (обзор [31]). Нами показано, что липосомы, нагруженные липофильным пролекарством сарколизина и оснащенные тетрасахаридом Sialyl Lewis X (SiaLe<sup>X</sup>), существенно превосходят по противоопухолевому эффекту как исходный препарат, так и лекарственные липосомы без углеводного лиганда на модели рака молочных желез мышей [7].

В настоящей работе мы исследовали влияние углеводных лигандов на цитотоксические свойства липосом, нагруженных МТХ-DG, *in vitro* в отношении клеток острой лейкемии человека с различной чувствительностью к МТХ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью изучения профилей связывания с углеводами клеток лейкемии человека с разной чувствительностью к МТХ (CCRF-СЕМ и СЕМ/МТХ) были использованы углеводные флуоресцентные зонды – 18 гликоконъюгатов с флуоресцеинметченым полиакриламидом Sug-РАА-fluo [32], где заместители Sug представлены галактозидами, глюкозидами, гликозидами сиаловых кислот, маннозидами, сульф- и сиалоолигосахаридами. Сначала с помощью флуоресцентного микроскопа была сделана приблизительная визуальная оценка степени окрашивания зондами клеток, фиксированных в мягких условиях на предметных стеклах. Резистентные клетки СЕМ/МТХ в подавляющем большинстве случаев связывались с зондами слабее, чем чувствительные клетки родительской линии СЕМ-CCRF.

Известно, что в ходе развития патологических процессов (воспаление, злокачественное перерождение, метастазирование) лейкоциты экспрессируют селектины (мембраносвязанные лектины), лигандами для которых служат сиало- и сульфополисахариды [33, 34]. Действительно, наибольшее сродство к клеткам опухоли лимфобластной этиологии продемонстрировали зонды PAA-fluo, несущие углеводные лиганды 3- $\text{HSO}_3\text{Gal}\beta$ -, NeuNAc $\alpha$ -, 6'- $\text{HSO}_3\text{LacNAc}\beta$ - и SiaLe $^X$ . Сравнительная количественная оценка уровней их связывания была получена с помощью проточной цитофлуориметрии (рис. 2). Клетки обеих линий (CCRF-CEM и SEM/MTX) в равной и наибольшей степени связывались с зондом, несущим тетрасахарид SiaLe $^X$  – наиболее аффинный лиганд селектинов [33]. С такой же интенсивностью клетки CEM-CCRF связывались с сиаловой кислотой. В то же время резистентные клетки SEM/MTX показали более высокий уровень связывания с сульфатированными углеводами, причем разница по сравнению с клетками CEM-CCRF больше для зонда 6'- $\text{HSO}_3\text{LacNAc}\beta$ -PAA-fluo.

Для конструирования адресных лекарственных липосом в данной работе мы выбрали два лиганда – SiaLe $^X$ , показавший наибольший и одинаковый уровень связывания с клетками двух линий, и 6'- $\text{HSO}_3\text{LacNAc}$ , который представился нам интересным с точки зрения сравнения его влияния на цитотоксичность в культурах клеток с разной чувствительностью к MTX. Липофильные гликоконъюгаты для встраивания в липосомы синтезировали по разработанной ранее методике [35] (структуры представлены на рис. 1). Конъюгат, содержащий неактивный пентаол, использовали в качестве контрольного.

Липосомы получали из смесей природных фосфолипидов с MTX-DG и гликоконъюгатами стандартным методом экструзии через мембранные фильтры с размером пор 100 нм [36, 29]. При этом образуются готовые к использованию моноламеллярные (с единичным липидным бислоем) липосомы требуемого размера, несущие модифицированное лекарство и углеводный лиганд. Схематически липосомная конструкция изображена на рис. 1. Контакт с рецептором-лектином на поверхности клетки-мишени обеспечивается за счет экспонирования углеводных групп на достаточном расстоянии от мембраны с помощью полярных гибких вставок ПЭГ (степень полимеризации 6–10). Показано *in vitro*, что интенсивность фагоцитоза макрофагами печени липосом, оснащенных октадецил-ПЭГ-маннозильным конъюгатом, резко увеличивается при удлинении ПЭГ-вставки от 0 до 8 оксиэтильных звеньев (фагоцитоз опосредован маннозосвязывающим рецептором) [37]. В то же время дальнейшее увеличение длины ПЭГ повышает вероятность его изгиба в направлении поверхности липосомы [38].

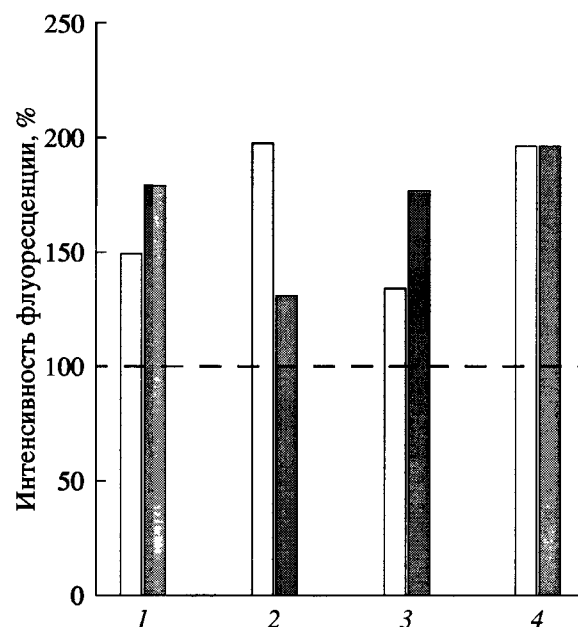
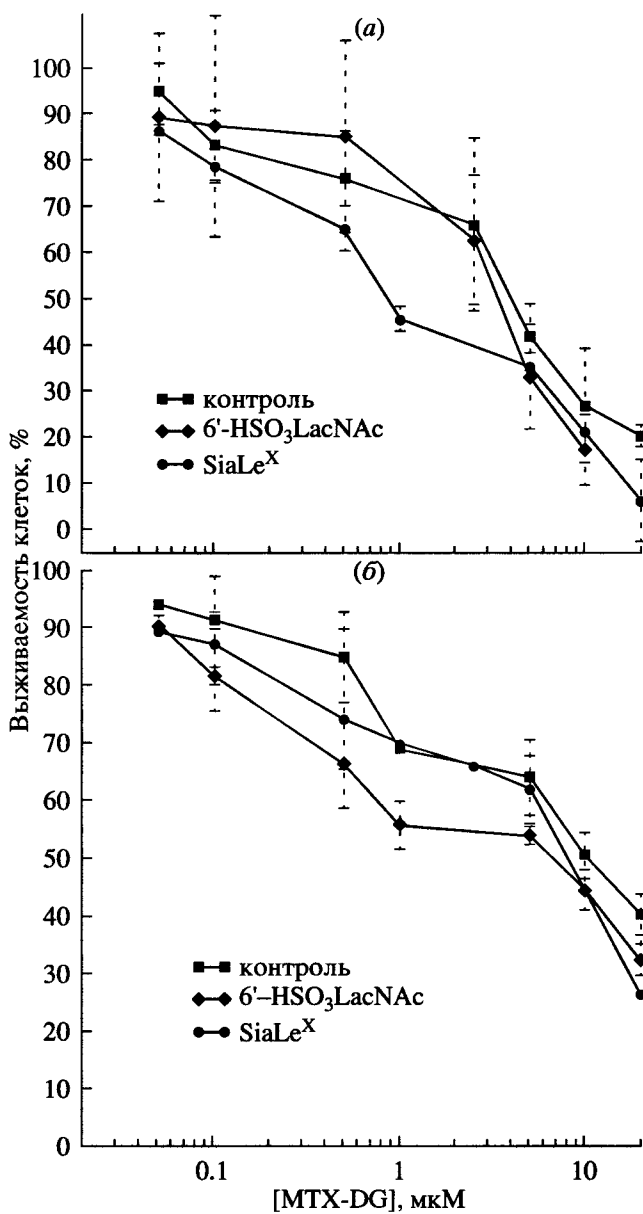


Рис. 2. Связывание зондов Sug-PAA-fluo с клетками CEM-CCRF (белые столбики) и SEM/MTX (серые столбики). Приведена относительная интенсивность флуоресценции клеток, инкубированных с углеводными зондами 3- $\text{HSO}_3\text{Gal}\beta$ - (1), NeuNAc $\alpha$ - (2), 6'- $\text{HSO}_3\text{LacNAc}\beta$ - (3) и SiaLe $^X$ -PAA-fluo (4) (в процентах); контроль – флуоресценция клеток, инкубированных с зондом PAA-fluo, не содержащим углеводных остатков. Данные цитофлуориметрического анализа одного репрезентативного эксперимента.

Известные Stealth-липосомы формируются из фосфолипидов, содержащих насыщенные ацильные остатки (обычно, гидрогенизированный соевый лецитин), и холестерина (до 30%). Чтобы уменьшить утечку препарата в кровотоке необходима жесткая мембрана [2, 3]. Предложенное нами липофильное пролекарство (MTX-DG) само является компонентом липидного бислоя и даже при его повреждении не покидает липосому [29]. Жидкий липидный бислой способен включить больше пролекарства. Более того, он легче сливается с мембранами опухолевых клеток [39]. Поэтому в нашем случае основу бислоя липосом (90 мол. %) – составляют фосфатидилхолин (PC) из яичного желтка и фосфатидилинозит (PI) из пекарских дрожжей, содержащие примерно половину насыщенных ацильных остатков (пальмитоильных и стеароильных), а остальные – ненасыщенные олеоильные и меньшее количество линолеоильных. Фосфатидилинозит должен защищать липосомы от адсорбции белков плазмы (опсонинов); показано, что остатки инозита молекул PI, составляющих примерно 10% бислоя, создают на поверхности липосом высокогидратированную стерически стабилизирующую оболочку, подобно остаткам ПЭГ (степень полимеризации 45–48) в Stealth-липосомах [40, 41]. Можно предположить, что PI не будет вызывать побочных эффектов, в том числе



**Рис. 3.** Оценка цитотоксичности липосомных препаратов MTX-DG, несущих лиганды SiaLe<sup>X</sup>, 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc или контрольный неактивный пентаол, в культурах клеток CEM-CCRF (а) и CEM/MTX (б). Через 48 ч инкубации проводили стандартный для антифолатов тест по включению трипанового синего. Приведены средние значения ±SE двух-четырёх независимых экспериментов, каждый из которых был проведен в двух повторах. Использована программа Origin 6.0 (MicroCal Software Inc., США).

аллергических реакций, и мукозита (заболевание слизистых оболочек, в первую очередь, ротовой полости), которые сопутствуют применению Stealth-липосом [42].

Цитотоксические свойства липосомных препаратов MTX-DG различного состава в культурах

клеток CEM-CCRF (рис. 3а) и CEM/MTX (рис. 3б) определяли стандартным тестом с трипановым синим. Менее трудоемкий и широко применяемый МТТ-тест [43] основан на спектрофотометрической оценке статуса митохондрий. Включение же трипанового синего позволяет делать вывод о состоянии клетки в целом, и поэтому именно этот метод применяется в исследованиях цитостатика МТХ и его производных (например, [12, 27]).

Расчитанные значения цитотоксической активности (концентрации, вызывающей ингибирование пролиферации клеток на 50%, IC<sub>50</sub>), приведены в таблице. Наибольшее влияние на цитотоксичность МТХ-липосом оказал SiaLe<sup>X</sup>-лиганд в отношении чувствительных клеток лейкемии: величина IC<sub>50</sub> уменьшилась более чем в 3.5 раза по сравнению с контрольными МТХ-липосомами, несущими неактивный пентаол. Влияние SiaLe<sup>X</sup> на цитотоксичность лекарственных липосом в случае резистентных клеток CEM/MTX было гораздо меньше (IC<sub>50</sub> уменьшилась примерно в 1.3 раза), несмотря на одинаковый с клетками CEM-CCRF уровень связывания зонда SiaLe<sup>X</sup>-PAA-fluo (рис. 2). Лиганд 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc практически не оказал влияния на цитотоксическую активность в отношении клеток CEM-CCRF и в то же время проявил отчетливый, хотя и умеренный эффект, в культуре клеток CEM/MTX: IC<sub>50</sub> уменьшилась более чем в 1.6 раза. Таким образом, для МТХ-липосом, несущих 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc, резистентность клеток CEM/MTX составила показатель 2, в то время как для контрольных МТХ-липосом — почти 3.6.

Статистически достоверное влияние углеводных лигандов на цитотоксические свойства липосомных препаратов МТХ-DG особенно отчетливо наблюдается при малых концентрациях лекарственного начала (рис. 3), что может иметь важное значение при введении в организм. Кроме того, по нашим данным, умеренное усиление цитотоксичности липосомных лекарственных препаратов в культурах клеток приводило к значительным противоопухолевым эффектам в опытах *in vivo* на животных [6, 7] (и неопубл. данные). Наконец, рост гетерогенности опухоли в процессе ее развития, формирование различных клонов злокачественных клеток, в том числе резистентных к лекарствам, делают весьма проблематичной возможность воздействия лекарственных средств за счет активного транспорта с помощью высокоаффинного специфичного молекулярного адреса (в связи с этим разрабатываются липосомные системы, направленные на клетки микроокружения опухоли, такие, как иммунокомпетентные клетки, эндотелиальные клетки образующейся *de novo* сосудистой системы, перициты и др. [44]). Мы полагаем, что “тонкая настройка” адреса путем варьирования углеводных лигандов на поверхности липосом должна помочь быстро приспосабливаться к изменениям, возникающим в опухолевой ткани в ходе разви-

тия болезни, при конструировании этих систем доставки лекарств.

В заключение отметим, что липосомы, нагруженные MTX-DG и оснащенные SiaLe<sup>X</sup>-лигандом, уже показали свое преимущество по сравнению с интактным метотрексатом и MTX-липосомами без углевода в первой серии экспериментов на модели острого Т-лимфолейкоза мышей [45].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гликоконъюгаты с флуоресцеинмеченым полиакриламидом (Sug-PAA-fluo) были любезно предоставлены фирмой "Lectinity" (Москва, Россия). В них использованы 18 углеводных зондов, содержащих остатки GalNAc $\beta$ , GalNAc $\alpha$ , Glc $\beta$ , Glc $\alpha$ ,  $\alpha$ -D-Man-6-фосфат, 3-*O*-HSO<sub>3</sub>Gal $\beta$ , 6-*O*-HSO<sub>3</sub>GlcNAc $\beta$ , NeuNAc $\alpha$ , Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ , GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ , 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc, (NeuNAc $\alpha$ 2-8)<sub>2</sub>, (NeuNAc $\alpha$ 2-8)<sub>3</sub>, Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ Le<sup>X</sup>, Gal $\beta$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-4)GlcNAc $\beta$  (Le<sup>A</sup>), GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$  (трисахарид А), Gal $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$  (трисахарид В), Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$  (SiaLe<sup>X</sup>). Молекулярная масса конъюгатов 30–40 кДа; содержание углеводных лигандов – 20%, флуоресцеина – 1%. Для приготовления липосом использовали яичный фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилинозит (PI) из *S. cerevisiae* производства "Реахим" (Россия). Липофильные гликоконъюгаты для встраивания в липосомы синтезировали из 3-аминопропилгликозидов [46] или 1-амино-1-дезоксиглюцита (получали восстановлением боргидридом натрия глюкозил-амин) и луброла PX (Sigma, США) как описано ранее [35]. Диглицеридный конъюгат MTX синтезировали как описано [22, 23]. Растворители очищали стандартными методами; упаривания проводились в вакууме при температурах не выше 40°C. Готовили буфер с 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA, Sigma): PBS, pH 7.06 – физиологический раствор на фосфатном буфере (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 г/л; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.15 г/л; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 г/л; KCl, 0.2 г/л; NaCl, 8.0 г/л).

**Культивирование клеток Т-лимфобластоидной лейкемии человека (линия СЕМ-CCRF) и MTX-резистентной сублинии (СЕМ/MTX)** проводили при 37°C в атмосфере 4% CO<sub>2</sub> в среде RPMI–1640 (ICN Biomedicals Inc., США) с добавлением 0.2% NaHCO<sub>3</sub>, 2 мМ L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицина G, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% телячьей эмбриональной сыворотки (инактивированной нагреванием) (Gibco BRL, Великобритания), pH 7.4, и пересеванием 2 раза в неделю. Для экспериментов использовали клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста.

**Визуальная оценка связывания клеток с углеводными флуоресцентными зондами.** Клетки дважды промывали PBS, наносили на предметные стекла, высушивали и фиксировали в парах 10% формаль-

Цитотоксическая активность (IC<sub>50</sub>, мкМ) липосомных препаратов MTX-DG с углеводными лигандами в культурах клеток острой лейкемии человека с разной чувствительностью к MTX<sup>a</sup>

Углеводный лиганд	Клетки СЕМ-CCRF	Клетки СЕМ/MTX
SiaLe <sup>X</sup>	0.86 ± 0.03	7.96 ± 0.98
6'-HSO <sub>3</sub> LacNAc	3.21 ± 0.25	6.58 ± 0.51
Контроль	3.03 ± 0.71	10.83 ± 2.37

<sup>a</sup> Приведены средние значения ±SE двух–четырех независимых экспериментов, каждый в двух повторах.

дегида 3 мин. Наносили на клетки растворы Sug-PAA-fluo (1 мМ по углеводным остаткам, 50 мкл) и инкубировали 1 ч при 20°C во влажной атмосфере. Промывали фиксированные клетки водой и высушивали на воздухе. Связывание зондов оценивали визуально с помощью флуоресцентного микроскопа Leitz Orthoplan (Германия) с фильтрами, установленными на возбуждение при 495 нм и испускание при 530 нм. Контроль неспецифического связывания – окрашивание зондом PAA-fluo, не содержащим углеводных остатков.

**Цитофлуориметрический анализ.** Подготовку клеток и инкубацию с зондами проводили как описано [47]. Культивированные клетки промывали 3 раза холодным 0.2% раствором бычьего сывороточного альбумина в PBS (PBA) и инкубировали с углеводными зондами Sug-PAA-fluo (100 мкг/мл) в течение 40 мин при +4°C. Концентрация клеток составляла 2 × 10<sup>5</sup>/100 мкл. После инкубации клетки промывали холодным PBA и анализировали на проточном цитофлуориметре EPICS-5 (Coulter Electronics Inc., США). В качестве отрицательного контроля использовали зонд PAA-fluo.

**Приготовление дисперсий липосом.** Смеси PC, PI, MTX-DG, гликоконъюгата, 8 : 1 : 1 : 0.2 (мол. соотношение) в хлороформе – метаноле, 1 : 1 соупаривали в круглодонных пробирках на роторном испарителе. Обычно смеси содержали по 0.625 мг PC, 0.08 мг PI, 0.12 мг (0.1 мкмоль) MTX-DG и 15–32 мкг гликоконъюгатов. Липидные пленки высушивали 30 мин при 5 Па (или ночь при 60 Па), затем гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 0.5 мл PBS-буфера с 1 мМ EDTA. Суспензию встряхивали, подвергали 5-кратной процедуре замораживания–оттаивания (жидкий азот – +40°C) и продавливали 20 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размером пор 100 нм с помощью установки Mini-extruder от Avanti Polar Lipids (США) в стерильных условиях. Конечную концентрацию MTX-DG в липосомальной дисперсии контролировали, измеряя УФ-спектры в этаноле (MTX-DG:  $\lambda_{\max}$  = 302 нм) на спектрофотометре СФ-256-УВИ (Ломофотоника, С.-Петербург). Размеры липосом определяли на приборе

Submicron Particle Sizer Nicomp 380 (США). Для разных образцов диаметр липосом составлял в среднем 100–120 нм (Гауссово распределение узкое:  $\pm 20$  нм). Дисперсии липосом хранили при +4°C и использовали в течение 2 сут.

**Определение цитотоксической активности.** Клетки инкубировали 48 ч в культуральной среде в 24-луночных планшетах с липосомами, содержащими МТХ-DG (концентрации МТХ-DG от 0.05 до 20 мкМ). Контрольные клетки инкубировали с аликвотой PBS с 1 мМ EDTA. Количество живых клеток определяли стандартным тестом с трипановым синим; выживаемость клеток вычисляли как (количество живых клеток в эксперименте, отнесенное к количеству живых клеток в контроле)  $\times 100$ . Эксперименты проводили 2–4 раза, в двух повторениях каждый. Цитотоксическую активность ( $IC_{50}$ , концентрацию вещества, вызывающую ингибирование пролиферации клеток на 50%) рассчитывали с помощью программы Origin 6.0 (MicroCal Software Inc., США).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 06-04-49432).

Авторы благодарят д-ра Джона Макгира (John McGuire, Институт рака Roswell Park, г. Буффало, шт. Нью-Йорк, США) за предоставленные образцы клеточных линий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maeda H., Sawa T., Konno T. // *J. Control. Release.* 2001. V. 74. P. 47–61.
- Lasic D.D., Papahadjopoulos D. // *Liposomes Revisited. Science.* 1995. V. 267. P. 1275–1276.
- Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. // *Clin. Pharmacokinet.* 2003. V. 42. P. 419–436.
- Wong A., Toth I. // *Curr. Med. Chem.* 2001. V. 8. P. 1123–1136.
- Schwendener R., Schott H. // *Methods Enzymol.* 2005. V. 391. P. 58–70.
- Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Сыркин А.Б. // *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1997. Т. 123. С. 439–441.
- Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. // *Eur. J. Cancer.* 2000. V. 36. P. 942–949.
- Gabizon A.A., Tzemach D., Horowitz A.T., Shmeeda H., Yeh J., Zalipsky S. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. P. 1913–1920.
- McGuire J.J. // *Curr. Pharm. Design.* 2003. V. 9. P. 2593–2613.
- Pui C.-H. // *N. Engl. J. Med.* 1995. V. 332. P. 1618–1630.
- Hou Z., Ye J., Haska C.L., Matherly L.H. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 33588–33596.
- Bram E., Ifergan I., Shafran A., Berman B., Jansen G., Assaraf Y.G. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2006. V. 58. P. 826–834.
- Assaraf Y.G., Molina A., Schimke R.T. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1989. V. 81. P. 290–294.
- Dean M., Harmon Y., Chimini G. // *J. Lipid Res.* 2001. V. 42. P. 1007–1017.
- Wielinga P., Hooijberg J.H., Gunnarsdottir S., Kathmann I., Reid G., Zelcer N., Vanderborn K., Dehaas M., Vanderheijden I., Kaspers G., Wijnholds J., Jansen G., Peters G., Borst P. // *Cancer. Res.* 2005. V. 65. P. 4425–4430.
- Volk E.L., Schneider E. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 5538–5543.
- Mamot C., Drummond D.C., Hong K., Kirpotin D.B., Park J.W. // *Drug Resist. Updates.* 2003. V. 6. P. 271–279.
- Gurdag S., Khandare J., Stapels S., Matherly L.H., Kannan R.M. // *Bioconjugate Chem.* 2006. V. 17. P. 275–283.
- Liang L.S., Wong W., Burt H.M. // *J. Pharm. Sci.* 2005. V. 94. P. 1204–1215.
- Chau Y., Dang N.M., Tan F.E., Langer R. // *J. Pharm. Sci.* 2006. V. 95. P. 542–551.
- Ofner C.M., Pica K., Bowman B.J., Chen C.S. // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 308. P. 90–99.
- Vodovozova E.L., Evdokimov D.V., Molotkovsky Jul.G. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2004. V. 30. P. 599–601 (Водовозова Е.Л., Евдокимов Д.В., Молотковский Ю.Г. // *Биоорган. химия.* 2004. Т. 30. С. 663–665).
- Водовозова Е.Л., Гаенко Г.П., Бобрикова Е.С., Пазынина Г.В., Молотковский Ю.Г. // *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41. С. 10–14.
- Williams A.S., Love W.G., Williams B.D. // *Int. J. Pharm.* 1992. V. 85. P. 189–197.
- Williams A., Goodfellow R., Topley N., Amos N., Williams B. // *Inflam. Res.* 2000. V. 49. P. 155–161.
- Rosowsky A., Forsch R.A., Yu C.-S., Lazarus H., Beard-sley G.P. // *J. Med. Chem.* 1984. V. 27. P. 605–609.
- Pignatello R., Spampinato G., Sorrenti V., Di Giacomo C., Vicari L., McGuire J.J., Russell C.A., Puglisi G., Toth I. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000. V. 10. P. 237–245.
- Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Gaenko G.P., Molotkovsky J.G. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2007. V. 33. P. 436–438 (Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. // *Биоорган. химия.* 2007. Т. 33. С. 470–473).
- Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. // *Рос. нанотехнологии.* 2008. Т. 3. С. 162–172.
- Sapra P., Allen T.M. // *Prog. Lipid Res.* 2003. V. 42. P. 439–462.
- Bies C., Lehr C.-M., Woodley J.F. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. V. 56. P. 425–435.
- Bovin N.V., Korchagina E.Y., Zemlyanukhina T.V., Byramova N.E., Galanina O.E., Zemlyakov A.E., Ivanov E., Zubov V.P., Mochalova L.S. // *Glycoconjugate J.* 1993. V. 10. P. 142–151.
- Gabius H.-J., Siebert H.-C., Andre S., Jimenez-Barbero J., Rudiger H. // *ChemBioChem.* 2004. V. 5. P. 740–764.
- Ehrhardt C., Kneuer C., Bakowsky U. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004. V. 56. P. 527–549.

35. Водовозова Е.Л., Хайдуков С.В., Гаенко Г.П., Бондарчук Т.И., Михалев И.И., Гречишников И.В., Молотковский Ю.Г. // Биорган. химия. 1998. Т. 24. С. 760–767.
36. Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D. // Biochim. Biophys. Acta. 1979. V. 557. P. 9–23.
37. Engel A., Chatterjee S.K., Alarifi A. // Pharm. Res. 2003. V. 20. P. 51–57.
38. Engel A., Chatterjee S.K., Alarifi A., Nuhn P. // J. Pharm. Sci. 2003. V. 92. P. 229–235.
39. Funaki N.O., Tanaka J., Kohmoto M., Sugiyama T., Ohshio G., Nonaka A., Yotsumoto F., Takeda Y., Imamura M. // Oncol. Rep. 2001. V. 8. P. 527–532.
40. Gabizon A., Papahadjopoulos D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 6949–6953.
41. Muller M., Zschornig O., Ohki S., Arnold K. // J. Membrane Biol. 2003. V. 192. P. 33–43.
42. Romberg B., Metselaar J.M., Baranyi L., Snel C.J., Bunger R., Hennink W.E., Szabeni J., Storm G. // Int. J. Pharm. 2007. V. 331. P. 186–189.
43. Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63.
44. Schiffelers R.M., Storm G. // Int. J. Pharm. 2008. V. 364. P. 258–264.
45. Водовозова Е.Л., Мусеева Е.В., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г. // Росс. биотерапевт. журн. 2008. Т. 7. С. 24–33.
46. Nifant'ev N.E., Tsvetkov Y.E., Shashkov A.S., Kononov L.O., Menshov V.M., Tuzikov A.B., Bovin N.V. // J. Carbohydr. Chem. 1996. V. 15. P. 939–953.
47. Rapoport E.M., Mochalova L.V., Gabius H.J., Romanova J., Bovin N.V. // Glycoconj. J. 2006. V. 23. P. 115–125.

## The Influence of Carbohydrate Ligands on the Cytotoxicity of Liposomes Bearing a Methotrexate–Diglyceride Conjugate in Human Acute Leukemia Cell Cultures

N. R. Kuznetsova, G. P. Gaenko, S. V. Haidukov, N. V. Bovin, and E. L. Vodovozova<sup>#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 330-6610; fax: +7 (495) 330-6601; e-mail: elvod@ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

The efficiency of the chemotherapeutic agent methotrexate (MTX) in tumor cells is limited by the frequent development of the drug resistance of tumor cells. We had previously shown in vitro using human acute leukemia cells with various sensitivity to MTX (T-lymphoblastic CCRF-CEM line and resistant CEM/MTX subline) that MTX incorporation into liposomes as a lipophilic prodrug, diglyceride conjugate (MTX-DG), allows for the overcoming of cell resistance due to the impaired active transmembrane transport. In this work, we have studied the profile of binding with carbohydrates of the cell lines mentioned using carbohydrate fluorescent probes (poly(acryl amide) conjugates). Lipophilic conjugates of tetrasaccharide Sial<sub>6</sub> 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc, and also inactive pentaol for incorporation into liposomes, have been synthesized. The cytotoxicity of MTX-DG liposomes equipped with the Sial<sub>6</sub> ligand toward the sensitive CCRF-CEM cell culture was demonstrated to be 3.5 times higher than that of MTX-DG liposomes bearing the control inactive pentaol. The activity of MTX liposomes bearing 6'-HSO<sub>3</sub>LacNAc toward resistant CEM/MTX was 1.6-fold increased. The use of carbohydrate ligands as molecular addresses for drug-carrying liposomes as a potential method of treating heterogeneous tumor tissue is discussed.

**Key words:** glycoconjugates, lectins, leukemia, lipophilic prodrugs, liposomes, methotrexate, tumor cell resistance