

УДК 577.352.2:615.015

E. V. Tolcheva, N. A. Oborotova

LIPOSOMES AS THE CARRIERS FOR DELIVERY OF BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES

N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center RAMS, Moscow

ABSTRACT

Liposomes, microscopic phospholipid bubbles with a bilay membrane structure, are the subject of great interest as carriers for delivery of drug, proteins, peptides, DNA, antisense oligonucleotides. Attachment of ligands promoting the selective binding of antigen or receptor to cell surface furthers the targeting delivery of liposomes to cell. The choice of targeting ligand depends on antigen/receptor expressed on the cell surface.

Key words: liposomes, PEG-liposomes, ligands for targeting transport, drug delivery.

E. B. Толчева, Н. А. Оборотова

ЛИПОСОМЫ КАК ТРАНСПОРТНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ

ГВ РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН, Москва

РЕЗЮМЕ

Липосомы — микроскопические фосфолипидные везикулы, образованные одной или несколькими бислойными мембранами, — вызывают большой интерес как транспортное средство для доставки химиопрепаратов (антибиотиков, цитостатиков, фотосенсибилизаторов), белков, пептидов, ДНК, антисмысловых олигонуклеотидов. Присоединение к поверхности липосом лигандов, способных специфически связываться с антигенами или рецепторами на поверхности клетки, обеспечивает направленный транспорт липосом к клетке-мишени. Выбор лиганда зависит от антигена/рецептора, экспрессированного на поверхности клетки, куда необходимо доставить липосомы.

Ключевые слова: липосомы, пэгилированные липосомы, лиганды для направленного транспорта, доставка лекарственных препаратов.

ВВЕДЕНИЕ

Первоначально липосомы использовались как модельные системы биологических мембран для научных исследований. Фосфолипиды и другие амфифильные молекулы способны самостоятельно формировать бислойные липидные мембраны (БЛМ), отделяющие внутреннее пространство липосомы от внешней среды. БЛМ по многим параметрам сходны с клеточными мембранами, что дает возможность использовать их в качестве моделей для изучения структуры и функций последних, а также внутримембранного белок-липидного взаимодействия. На сегодняшний день липосомы широко используются как транспортное средство для доставки множества биологически активных молекул, таких как ДНК, олигонуклеотиды, белки, пептиды и различные лекарственные препараты (антибиотики, цитостатики и др.).

Липосомальные системы доставки широко применяются в противоопухолевой терапии, т. к. способствуют повышению терапевтического эффекта и снижению токсичности лекарственного препарата по сравнению с его свободной формой. В настоящее время ряд липосомальных препаратов успешно применяется в клинике (табл. 1). Первоначальный успех, достигнутый в работе с липосомальными формами многих лекарственных препаратов, послужил толчком для дальнейших клинических исследований. Так, например, результатом применения противоопухолевого препарата доксорубицина, включенного в пэгилированные липосомы, для лечения больных метастатическим раком молочной железы стало увеличение продолжительности жизни [13; 30; 40]. Положительные результаты были получены при комбинированной терапии, состоящей из доксила и цисплатина [29], мице-

та и паклитаксела [48] или келикса и карбоплатина [10]. Клинические исследования показали впечатляющий результат при терапии кожной Т-клеточной лимфомы [57] и саркомы [49] доксорубицином в пэгилированных липосомах в сравнении со свободным препаратом.

Таблица 1.

Липосомальные лекарственные препараты, разрешенные для клинического применения

Препарат	Производитель	А активное вещество	Структура	Показания
Амбисам/ AmBisome	Gilead (NeXstar)	Амфотерицин Б	Липосомы	Грибковые инфекции
Абелсет/ AB EL CET	Gilead (NeXstar)	Амфотерицин Б	Липосомы	Грибковые инфекции
DaunoXome	Gilead (NeXstar)	Даунорубин	Липосомы	Саркома Капоши
Доксил/Doxil	Alza (Sequus)	Доксорубин	ПЭГ-липосомы	Саркома Капоши, рак яичников,
Келикс/Caelyx	Schering-Plough	Доксорубин	ПЭГ-липосомы	рецидивирующий рак молочной железы
Мицет/Myocet	Elan (TLC)	Доксорубин	Липосомы	Рецидивирующий рак молочной железы
Алтраген/ Altragen	—	Ретиноевая кислота	Липосомы	Острый миелоидный лейкоз, неходжкинская лимфома, саркома Капоши, почечно-клеточная карцинома
Нитрен/ Nyotran	—	Нистатин	Липосомы	Грибковые инфекции
NX211	—	Lurtotecan/ Луртотекан	Липосомы	Рак яичников
—	—	Annamycin	Липосомы	Доксорубин-резистентные опухоли

ЭВОЛЮЦИЯ МЕТОДА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Пассивный транспорт (ненаправленные липосомы)

Первое поколение липосом, так называемые классические липосомы, имело один существенный недостаток — быстрый захват и удаление из кровотока липосомальных препаратов клетками ретикулоэндотелиальной системы, что затрудняло доставку препаратов к опухоли. Классические липосомы, к поверхности которых были присоединены антитела, обладали аналогичным недостатком. Для увеличения времени циркуляции липосом в кровотоке было предложено покрыть поверхность липосом инертными биосовместимыми полимерами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), которые формируют защитный слой и препятствуют распознаванию белками плазмы крови (опсонины) и, следовательно, дальнейшему клиренсу [22].

Включение противоопухолевых препаратов в пространственно стабилизированные липосомы увеличи-

вает их накопление в тканях с повышенной проницаемостью сосудов. Наличие прерывистого эндотелия и другие капиллярные аномалии, найденные в сосудистой сети опухоли во время неоангиогенеза, способствуют проникновению липосом во внутритканевое пространство солидных опухолей и их накоплению, где они действуют как система, непрерывно высвобождающая лекарственный препарат [59]. Это явление получило название эффект повышенной проницаемости сосудов (EPR-effect) [31]. В последнее время пространственно стабилизированные липосомы подробно изучаются и широко используются в биомедицинских исследованиях *in vitro* и *in vivo*; они нашли также применение в клинической практике [10; 13; 30; 29; 40; 48; 49; 57].

Важным свойством защитных полимеров является их гибкость, которая позволяет относительно небольшому количеству присоединенных молекул создавать непроницаемый слой на липосомальной поверхности. Несмотря на то что ПЭГ по-прежнему остается лидером среди защитных полимеров, продолжают попытки найти другие соединения, которые могли бы быть использованы для получения пространственно стабилизированных липосом. Описано приготовление пространственно стабилизированных липосом с применением поли[N-(2-гидроксипропил)метакриламида] [56], поли-N-винилпирролидонов [53], биорасщепляемых полимер-липидных конъюгатов [39] и поливинилового спирта [50].

Роль липосом в противоопухолевой терапии не ограничивается доставкой лекарственных препаратов. Известно, что липосомы также могут быть использованы в борозахватывающей терапии (boron neutron capture therapy — BNCT) для селективной доставки терапевтических количеств атомов ^{10}B в опухолевые клетки [25].

Активный транспорт (направленные липосомы)

Несмотря на достигнутые результаты в использовании ненаправленных липосомальных систем доставки лекарственных препаратов, были проведены исследования с целью повышения эффективности и селективности действия липосомальных противоопухолевых препаратов посредством лиганд-опосредованного транспорта липосом. Это достигается присоединением направляющих векторных молекул к поверхности липосом. Лиганды способствуют селективному связыванию с опухолеассоциированными антигенами или рецепторами и доставке лекарственных препаратов непосредственно к месту их назначения. В качестве векторных молекул могут выступать, например, моноклональные антитела (МкА) или их фрагменты (Fab'-фрагменты МкА), пептиды, лиганды к специфическим рецепторам на поверхности клеток-мишеней и др.

Первые эксперименты были осуществлены посредством простой иммобилизации антитела и ПЭГ на поверхности одной и той же липосомы. Однако выяснилось, что защитный полимер может создавать пространственные препятствия для специфического свя-

звания антител с клеткой-мишенью [51]. Для достижения большей избирательности пэгилированных липосом было решено присоединять векторную молекулу к дистальному концу ПЭГ, чтобы лиганд находился снаружи плотной щетки полимера. В настоящее время используются различные современные технологии для присоединения лиганда к дистальному концу активированного ПЭГ-липидного конъюгата, встроенного в липосомы [1; 3]. Липосомы, к поверхности которых присоединены МкА или Fab'-фрагменты МкА, называли иммунолипосомами. Большинство принципов, применимых для иммунолипосом, также может быть использовано для липосом, модифицированных другими лигандами. С помощью направленных липосом могут быть селективно доставлены не только противоопухолевые низкомолекулярные препараты, но и макромолекулы, включая белки, пептиды, антисмысловые олигонуклеотиды и ДНК.

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ПОВЕРХНОСТИ ЛИПОСОМ

Для получения пространственно стабилизированных липосом, способных избирательно связываться с антигеном или рецептором на поверхности клеток-мишеней, необходимо ковалентно присоединить к их поверхности полимеры для защиты от действия ретикулоэндотелиальной системы и специфические лиганды для направленной доставки липосом к клеткам — белки, пептиды и другие молекулы. Методика присоединения основана на трех реакциях, которые являются достаточно эффективными и избирательными: 1) реакция между активированными карбоксильными группами и аминоклассами, в результате которой образуется амидная связь; 2) реакция между пиридилдитиолами и тиолами, в результате чего образуются дисульфидные связи; 3) реакция между малеимидными производными и тиолами, в результате которой формируются тиефирные связи [12]. Существуют и другие подходы, например образование карбаматной связи посредством реакции между *p*-нитрофенилкарбонильной и аминоклассами [52]. Кроме того, для присоединения лигандов к липосомальной поверхности используется метод нековалентного связывания — через образование комплекса биотин — авидин/стрептавидин [12; 47].

ЛИГАНДЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ЛИПОСОМ

Антиген-опосредованный транспорт липосом (направленный транспорт липосом с помощью моноклональных антител или Fab'-фрагментов моноклональных антител)

Моноклональные антитела или Fab'-фрагменты моноклональных антител часто используются для направленной терапии, в т. ч. для направленного транспорта липосом. Несмотря на то что первоначальные исследования были направлены на применение целых молекул антител в качестве направляющего вектора, в последнее время все большее внимание уделяется

Fab'-фрагментам как векторам, обладающим пониженной иммуногенностью и улучшенными фармакокинетическими параметрами. Важным преимуществом использования этого класса лигандов является возможность выбора фрагмента антитела, обладающего наиболее высокой аффинностью к клетке-мишени.

Анти-CD34 моноклональные антитела My10, направленные против антигена CD34, экспрессированного на поверхности лимфоцитов при остром миелоидном лейкозе, были использованы для получения My10-иммунолипосом [5; 38]. В экспериментах *in vitro* была доказана избирательная доставка доксорубина, включенного в My10-иммунолипосомы [5]. Биотинилированные OX26-иммунолипосомы (OX26-моноклональные антитела, направленные против трансферринового рецептора крысы) специфически связывались с трансферриновым рецептором клеток поперечнополосатых мышц в экспериментах *in vitro* [47]. Интересно, что для селективной доставки доксорубина к опухолевым клеткам лекарственный препарат доксил был модифицирован моноклональными антителами 2C5 против нуклеосом [28].

Доксорубин, как и большинство химиопрепаратов, является низкомолекулярным соединением, способным проникать в клетку путем пассивной диффузии. Однако для достижения большего терапевтического эффекта при доставке лекарственного средства с помощью иммунолипосом необходима интернализация антигена после связывания с антителом, как было показано, например, с клетками В-лимфомы и интернализирующимися эпитопами (CD19) [43]. Интересная концепция была разработана для доставки анти-HER-2-иммунолипосом к опухолевым клеткам, на поверхности которых экспрессирован антиген HER-2 [41].

Было показано, что при лечении группы мышей BALB/c с ксенотрансплантатами человеческой лимфомы Беркитта (клеточная линия Namalwa) анти-CD19(целые МкА)-иммунолипосомами, нагруженными доксорубином, и анти-CD19(Fab'-фрагменты МкА)-иммунолипосомами, нагруженными доксорубином, терапевтический эффект во втором случае был выше вследствие более длительной циркуляции иммунолипосом в кровотоке [44]. Fab'-фрагменты и целые антитела, направленные против ганглиозида GD₂, экспрессированного на поверхности клеток нейробластомы, были ковалентно присоединены к пэгилированным липосомам. Эффективность направленной доставки доксорубина с помощью иммунолипосом была проверена в экспериментах *in vitro* на GD₂⁺-клетках нейробластомы и *in vivo* на голых бестимусных мышках (Nude). Было показано полное ингибирование метастазов нейробластомы человека на модели голых бестимусных мышей при терапии Fab'-иммунолипосомами, нагруженными доксорубином [42].

Рецептор-опосредованный транспорт липосом Фолат-опосредованный транспорт липосом

Рецептор фолата (рецептор фолиевой кислоты, РФК) представляет собой присоединенный к гликозилфосфатидилинозитолу гликопротеин, который свя-

зывается с фолиевой кислотой и интернализует ее внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Фолатные рецепторы экспрессированы на опухолевых клетках при раке яичников, толстой кишки, молочной железы, легких, почечно-клеточной карциноме, метастазах эпителиальных опухолей в головной мозг и нейроэндокринной карциноме. Липосомы, модифицированные фолиевой кислотой, и нагруженные доксорубицином, проявили более высокий цитотоксический эффект в экспериментах *in vitro* на РФК+-клеточной линии по сравнению с ненаправленными липосомами, нагруженными тем же препаратом [8]. Было установлено, что возможна направленная доставка макромолекул, а также липосом в живые клетки с помощью РФК-опосредованного эндоцитоза, позволившая преодолеть множественную лекарственную устойчивость [11; 27]. Липосомный даунорубин, так же как и доксорубин, был доставлен в различные опухолевые клетки посредством фолиевой кислоты, при этом было показано увеличение цитотоксического эффекта [11]. Липосомы, модифицированные фолиевой кислотой, были предложены как транспортное средство для доставки антисмысловых олигонуклеотидов [23], а также генетического материала [15] в опухолевые клетки.

Трансферрин-опосредованный транспорт липосом

Рецептор-опосредованный эндоцитоз комплекса трансферринового рецептора и трансферрин-связанного железа — основной путь транспорта железа в клетку. Рецепторы трансферрина экспрессированы на поверхности множества опухолевых клеток, и поэтому антитела, направленные против трансферрина, так же как и сам трансферрин, являются популярными лигандами для транспорта липосом к опухолевым клеткам. Были проведены исследования по присоединению трансферрина к полиэтиленгликолю на поверхности пэгиллированных липосом для доставки лекарственных препаратов в солидные опухоли [18]. Антитела против трансферрина [58] были использованы для доставки генетического материала в клетки посредством катионных липосом. Трансферрин-опосредованная доставка липосом также успешно применялась для доставки к клеткам головного мозга. Иммунолипосомы, содержащие ОХ26-моноклональные антитела против трансферринового рецептора крысы, были использованы для доставки к эндотелиальным клеткам микрососудов мозга [16].

Интегрин-опосредованный транспорт липосом

Известно, что рост опухоли сопровождается образованием новых кровеносных сосудов (ангиогенезом). На поверхности эндотелиальных клеток активированных сосудов среди прочих белков экспрессированы интегриновые рецепторы $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ (табл. 2). Они обеспечивают адгезию эндотелиальных клеток к внеклеточному матриксу через последовательность Arg-Gly-Asp (RGD).

Несколько матриксных белков, содержащих RGD-последовательность, играют критическую роль в ангиогенезе и, следовательно, являются потенциальной мишенью для терапии, направленной на предотвращение образования новых сосудов.

Таблица 2.
Белки, экспрессированные на поверхности эндотелиальных клеток при ангиогенезе

CD34	Эндоглин
VEGF-рецептор	Tie2-рецептор
Эндосиалин	TNF- α -рецептор
Е-селектин	CD44
α_v -интегрины	Рецептор ангиостатина
MMP-2	Рецептор эндостатина
MMP-9	CM101-связывающий белок

Присоединение RGD-пептида к пэгиллированным липосомам привело к увеличению связывания этих липосом с эндотелиальными клетками пупочной вены человека [46]. С целью предотвращения агрегации тромбоцитов было предложено использовать RGD-липосомы для доставки антикоагулянтов или антитромбоцитарных фармацевтических средств к активированным тромбоцитам. Гипотеза была подтверждена экспериментально, вследствие чего RGD-липосомы могут применяться для избирательной доставки в сердечно-сосудистую систему [24]. Кроме того, пэгиллированные липосомы, нагруженные доксорубицином, были селективно доставлены посредством RGD-пептида к интегриновым рецепторам эндотелиальных клеток сосудов опухоли. Было показано увеличение противоопухолевой эффективности доксорубина, включенного в RGD-ПЭГ-липосомы, по сравнению с тем же препаратом, включенным в ненаправленные липосомы, на модели карциномы кишечника линии C26 мыши [44]. Аналогично этому ангиогенный пептид был использован для направленной доставки нагруженных лекарственным препаратом липосом к эндотелию сосудов при экспериментальном лечении опухолей у мышей [2].

Другие лиганды

Поиск новых лигандов для направленного транспорта липосом сфокусирован на изучении специфических рецепторов и белков-ферментов, синтезируемых в клетках-мишенях (особенно опухолевых клетках). Присоединение ATWLPPR-пептида, обладающего сродством к VEGF-рецептору, к пэгиллированным липосомам привело к увеличению их связывания с эндотелиальными клетками пупочной вены человека [19]. APRPG-пептид, способный специфически связываться с рецепторами эндотелиальных клеток активированных сосудов, конъюгировали с пэгиллированными липосомами для доставки модифицированного бензопорфирина при фотодинамической терапии [17]. NGR-пептид (Asn-Gly-Arg) — лиганд аминопептидазы N (CD13) — был использован для направленной доставки липосомального доксорубина в сосуды опухоли. Кроме того, циклический пептид CNGRCG, конъюгированный с цитокином TNF- α , способствовал направленному транспорту последнего в сосуды опухоли [6]. Липосомы, к поверхности которых были присоединены MкА C225, направленные против рецептора

EGF/EGFvIII, были селективно доставлены к различным опухолевым клеткам, на поверхности которых экспрессирован EGF-рецептор [32]. Известно, что EGF-рецептор экспрессирован на клетках различных солидных опухолей: рак молочной железы, рак легких, глиома, рак толстой кишки и др.

ЛИПОСОМЫ КАК СРЕДСТВО ДЛЯ ТРАНСПОРТА БЕЛКОВ И ПЕПТИДОВ

Множество низкомолекулярных лекарственных препаратов проникают в клетку путем пассивной диффузии через клеточную мембрану, но большое количество биологически активных молекул, таких как белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, не способны самостоятельно проходить через биологические мембраны. Транспорт этой группы препаратов в цитоплазму полностью зависит от систем доставки, которые обеспечивают их перемещение через мембраны.

Липосомальные белки

Важным преимуществом использования липосом для лечения злокачественных новообразований и наследственных заболеваний, связанных с неправильным функционированием внутриклеточных ферментов, является возможность заключенных в липосому ферментов проникать в цитоплазму клеток-мишеней [33].

Направленная доставка в одной иммунолипосоме pH-чувствительного дестабилизирующего мембрану diNF-7-пептида слияния и цепи A дифтерийного токсина привела к резкому увеличению цитотоксического эффекта в экспериментах на клетках карциномы яичников. Пептид diNF-7 как в свободной форме, так и инкапсулированный в липосому проявил способность индуцировать слияние мембраны липосомы и эндосомы, обеспечивая тем самым выход липосомального содержимого в цитоплазму [35].

Применение аспарагиназы, заключенной в липосомы, увеличило выживаемость животных с аспарагинзависимыми опухолями P1534 по сравнению со свободным ферментом [9]. Важной особенностью этого метода является то, что инкапсулирование аспарагиназы в липосомы предотвращает выработку антител против аспарагиназы.

Экспериментальная тромболитическая терапия тромбоза яремной вены у кроликов индуктором плазминогена, заключенным в липосомы, показала более высокую степень лизиса по сравнению со свободным нативным ферментом. Для достижения аналогичных результатов потребовалось применить дозу нативного фермента в 4 раза выше, чем липосомального [14].

Применение фосфолипидных пролекарств (предшественников лекарств), встроенных в липосомальные мембраны, по сравнению со свободными препаратами дает несколько преимуществ: высокая эффективность встроенного пролекарства, отсутствие вытекания его из липосом в водную фазу, защищенность от метаболической деградации, возможность использования как препаратов пролонгированного действия [33; 35].

Липосомальные пептиды

Как известно, липосомы накапливаются преиму-

щественно в печени, что послужило поводом их использования для доставки инсулина. Липосомальный гормон проявил себя как препарат пролонгированного действия за счет увеличения продолжительности циркуляции инсулина в кровотоке и его постепенного высвобождения из липосом, обеспечивая тем самым постоянство его концентрации в крови в течение длительного времени. Фармакодинамика инсулина в пэгиллированных липосомах при внутривенном введении была изучена в экспериментах *in vivo* [20]. Попытка увеличить биодоступность орального липосомального инсулина в экспериментах на животных путем покрытия поверхности липосом полиэтиленгликолем принесла положительные результаты. Эффективность такого метода доставки была подтверждена на крысах [21]. Интерес к липосомальному инсулину как для орального, так и для внутривенного применения остается достаточно высоким.

Другим примером использования липосомальных пептидов стало применение липосомального циклоспорина при трансплантации солидных органов — предупреждение отторжения трансплантата после аллогенной трансплантации комбинированного препарата сердце-легкое. Эффективность применения липосомального циклоспорина в виде аэрозоля показана в экспериментах на собаках. Включение рекомбинантного интерлейкина-2 в липосомы способствовало снижению его токсичности и повышению биологической активности благодаря увеличению продолжительности его циркуляции в крови. Пэгиллированные липосомы также были предложены для орального применения рекомбинантного эпидермального фактора роста человека [7].

ЛИПОСОМЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Было проведено множество исследований липоплексов, которые представляют собой комплексы катионных и нейтральных липидов и молекул ДНК или антисмысловых олигонуклеотидов. Липоплексы используются в качестве системы для трансфекции клеток [26]. Положительный Z-потенциал катионных липоплексов приводит к их неспецифическому электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженной поверхностью клеток. Нейтральные липиды, такие как диолеилфосфатидилэтаноламин, способствуют интернализации и внутриклеточному высвобождению генетического материала.

Присоединение к поверхности липоплекса лиганда, направленного к интернализирующемуся антигену или рецептору, позволяет увеличить эффективность трансфекции. Использование RGD-содержащих липопептидов для получения липоплексов, направленных к интегриновым рецепторам, привело к 100-кратному увеличению эффективности трансфекции ДНК опухолевых клеток, экспрессирующих интегриновые рецепторы [55]. Были получены направленные катионные липосомы для доставки ДНК путем присоединения нейтральных липидов к моноклональным

антителам МОС31. Эти МкА способны специфически узнавать гликопротеин EGP-2, экспрессированный на клетках карциномы. Аналогично были модифицированы моноклональные антитела Herceptin, способные специфически узнавать белок HER-2/neu, экспрессированный на поверхности опухолевых клеток молочной железы и яичников. Применение таких направленных липосом для доставки ДНК привело к увеличению количества трансфицированных клеток [60]. Кроме того, катионные иммунолипосомы, направленные против рецептора трансферрина, были использованы для p53-опухоль-подавляющей генной терапии [58].

В последнее время было предложено использование поликатионных липосом для доставки генетического материала, которые представляют собой липосомы, модифицированные ацетилированным полиэтиленгликолем, присоединенным к мембране через ацетильные остатки и связывающим ДНК с помощью положительных зарядов. Такие липосомы демонстрируют высокую степень нагрузки ДНК (или другим генетическим материалом) и высокую эффективность трансфекции [34; 37].

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ЛИПИДНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ: ВИРОСОМЫ

Цитоплазма клеток является важным, но относительно недоступным компартментом для многих биологически активных макромолекул. Несмотря на то что липосомы широко используются для доставки биологических объектов, до сих пор липосомальная доставка макромолекул, не способных самостоятельно проходить через мембраны, была малоэффективна. Одним из способов повышения эффективности переноса макромолекул в цитоплазму является использование воссозданной оболочки человеческого вируса гриппа А.

Виромы представляют собой передовые, широко применяемые транспортные системы с перспективой использования для терапии опухолей и предотвращения метастазирования, нейродегенеративных изменений и инфекционных заболеваний. Различные биологически активные молекулы, такие как антибиотики, цитостатики, нуклеиновые кислоты, фунгициды и антигены, могут быть инкапсулированы в виросому. Поверхность виросомы так же, как и поверхность липосомы, может быть модифицирована различными низко- и высокомолекулярными соединениями [36].

Виромы — это сферические монослойные везикулы со средним диаметром 150 нм. Они представляют собой пустую оболочку вируса гриппа, лишенную нуклеокапсида, включая генетический материал самого вируса. В отличие от липосом виросомы содержат функциональные гликопротеины вирусной оболочки — гемагглютинин и нейраминидазу вируса гриппа, встроенные в фосфолипидный бислой. Характеристики виросом зависят от выбора компонентов бислоя. Они могут быть оптимизированы для максимального

включения препарата или достижения наилучшего физиологического эффекта путем изменения процентного содержания или типа липидов в мембране. В случае положительного заряда фосфолипидов виросомы также используются для доставки генетического материала. С целью обеспечения избирательной доставки поверхность виросомой может быть модифицирована различными лигандами, такими как цитокины, пептиды, моноклональные антитела.

Уникальные свойства виросом частично связаны с присутствием в их мембране гемагглютинина вируса гриппа. Он способствует связыванию с клеткой-мишенью и рецептор-опосредованному эндоцитозу. Заключение в эндосому виросомальный гемагглютинин, активированный кислым значением pH среды, способствует слиянию мембран и высвобождению биологически активных соединений в цитоплазму клетки-мишени. Это делает виросомы перспективными транспортными системами для доставки биологически активных молекул [4; 36].

Известно, что виросомы были использованы в вакцинах для доставки белковых антигенов [4]. Виромы, к поверхности которых были присоединены Fab'-фрагменты моноклональных антител анти-HER-2/neu, использовались в противоопухолевой терапии [53].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Липосомальные системы доставки постоянно развиваются. Такие свойства липосом, как биосовместимость, защита включенных веществ от захвата клетками ретикулоэндотелиальной системы и метаболической деградации, возможность доставки гидрофобных и гидрофильных соединений к различным органам и тканям организма и, более того, способность доставлять эти соединения в цитоплазму клетки-мишени, делают их привлекательными для использования как в медицине, так и в научных исследованиях. Достижения молекулярной биологии, обеспечившие большой выбор лигандов, и углубление понимания молекулярных механизмов заболевания помогают определить подходящие мишени для направленной доставки липосом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abra R. M., Bankert R. B., Chen F. et al. The next generation of liposome delivery systems: recent experience with tumor-targeted, sterically-stabilized immunoliposomes and active-loading gradients // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 1–3.
2. Asai T., Shimizu K., Kondo M. et al. Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels // *FEBS Lett.* — 2002. — Vol. 520. — P. 167–170.
3. Blume G., Cevc G., Crommelin M. D. et al. Specific targeting with poly(ethylene glycol)-modified liposomes: coupling of homing devices to the ends of polymeric chains combines effective target binding with long circulation times // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1993. — Vol. 1149. — P. 180–184.

4. Bungener L., Idema J., Veer W. et al. Virosomes in vaccine development: induction of cytotoxic T-lymphocytes activity with virosome-encapsulated protein antigens // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 155–163.
5. Carrion C., de Madariaga M. A., Domingo J. C. In vitro cytotoxic study of immunoliposomal doxorubicin targeted to human CD34+ leukemic cells // *Life Sciences.* — 2004. — Vol. 75. — P. 313–328.
6. Corti A., Ponzone M. Tumor vascular targeting with Tumor Necrosis Factor- α and chemotherapeutic drugs // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2004. — Vol. 1028. — P. 104–112.
7. Cryan S. Carrier-based strategies for targeting protein and peptide drugs to the lungs // *The AAPS Journal.* — 2005. — Vol. 7, No. 1. — P. 20–41.
8. Gabizon A., Shmeeda H., Horowitz A. T. et al. Tumor cell targeting of liposome-entrapped drugs with phospholipid-anchored folic acid-PEG conjugates // *Advanced Drug Delivery Reviews.* — 2004. — Vol. 56. — P. 1177–1192.
9. Gaspar M. M., Perez-Soler R., Cruz M. E. Biological characterization of L-asparaginase liposomal formulations // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 1996. — Vol. 38. — P. 373–377.
10. Goncalves A., Braud A. C., Viret F. et al. Phase I study of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in combination with carboplatin in patients with advanced solid tumors // *Anticancer Res.* — 2003. — Vol. 23, No. 4. — P. 3543–3548.
11. Goren D., Horowitz A. T., Tzemach D. et al. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump // *Clinical Cancer Research.* — 2000. — Vol. 6. — P. 1949–1957.
12. Hansen C. B., Kao G. Y., Moase E. H. et al. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1995. — Vol. 1239. — P. 133–144.
13. Harrington K. J., Mohammadtaghi S., Uster P. S. et al. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes // *Clinical Cancer Research.* — 2001. — Vol. 7. — P. 243–254.
14. Heeremans J. L., Prevost R., Bekkers M. E. et al. Thrombolytic treatment with tissue-type plasminogen activator (t-PA) containing liposomes in rabbits: a comparison with free t-PA // *Thromb. Haemost.* — 1995. — Vol. 73. — P. 488–494.
15. Hofland H. E., Masson C., Iginla S. et al. Folate-targeted gene transfer in vivo // *Molec. Ther.* — 2002. — Vol. 5, No. 6. — P. 739–744.
16. Huwyler J., Wu D., Padridge W. M. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — Vol. 93. — P. 14164–14169.
17. Ichikawa K., Hikita T., Maeda N. et al. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — Vol. 1669. — P. 69–74.
18. Ishida O., Maruyama K., Okinaga K. et al. Liposomes bearing polyethylene glucol-coupled transferring with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo // *Pharm. Res.* — 2001. — Vol. 18. — P. 1042–1048.
19. Janssen A. P., Schiffelers R. M., Hagen T. et al. Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy // *Int. J. Pharm.* — 2003. — Vol. 254. — P. 55–58.
20. Kim A., Yun M. O., Oh Y. K. et al. Phospholipid deformable vesicles for buccal delivery of insulin // *Chem. Phar. Bull. (Tokyo).* — 2002. — Vol. 50. — P. 749–751.
21. Kisel M. A., Kulik L. N., Tsybovsky I. S. et al. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in rat // *Int. J. Pharm.* — 2001. — Vol. 216. — P. 105–114.
22. Klibanov A. L., Maruyama K., Torchilin V. P. et al. Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes // *FEBS Lett.* — 1990. — Vol. 268. — P. 235–238.
23. Leamon C. P., Cooper S. R., Hardee G. E. Folate-liposome-mediated antisense oligodeoxynucleotide targeting to cancer cells: evaluation in vitro and in vivo // *Bioconjug. Chem.* — 2003. — Vol. 14. — P. 738–747.
24. Lestini B. J., Sagnella S. M., Xu Z. et al. Surface modification of liposomes for selective cell targeting in cardiovascular drug delivery // *J. Control. Release.* — 2002. — Vol. 78. — P. 235–247.
25. Li T., Hamdi J., Hawthorne F. M. Unilamellar liposomes with enhanced boron content // *Bioconjug. Chem.* — 2006. — Vol. 17. — P. 15–20.
26. Liu F., Huang L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery // *J. Control. Release* — 2002. — Vol. 78. — P. 259–266.
27. Lu Y., Low P. S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents // *Advanced Drug Delivery Reviews.* — 2002. — Vol. 54. — P. 675–693.
28. Lukyanov A. N., Elbayoumi T. A., Chakilam A. R. et al. Tumor-targeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody // *J. Control. Release.* — 2004. — Vol. 100. — P. 135–144.
29. Lyass O., Hubert A., Gabizon A. A. Phase I study of Doxil-Cisplatin combination chemotherapy in patients with advanced malignancies // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 3040–3046.
30. Lyass O., Uziel B., Ben-Yosef R. et al. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma // *Cancer (Phila.).* — 2000. — Vol. 89. — P. 1037–1047.
31. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting // — 2001. — Vol. 41. — P. 189–207.
32. Mamot C., Drummond D. C., Greiser U. et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 3154–3161.
33. Mastrobattista E., Crommelin D., Wilschut J. et al. Targeted liposomes for delivery of protein-based drugs into

- the cytoplasm of tumor cells // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 57–65.
34. *Mastrobattista E., Kapell R. H. G., Eggenhuisen M.H. et al.* Lipid-coated polyplexes for targeted gene delivery to ovarian carcinoma cells E. In: Targeted liposomes for cytosolic drug delivery to tumor cells / Ed. by E. Mastrobattista — Enschede, Netherlands: FEBODRUK BV, 2001. — P. 168–192.
 35. *Mastrobattista E., Koning G. A., Bloois L. et al.* Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins // *J. Biol. Chem.* — 2002. — Vol. 277, No. 30. — P. 27135–27143.
 36. *Mastrobattista E., Schoen P., Wilschut J.C. et al.* Targeting of influenza virosomes to ovarian carcinoma cells. In: Targeted liposomes for cytosolic drug delivery to tumor cells / Ed. by E. Mastrobattista — Enschede, Netherlands: FEBODRUK BV, 2001. — P. 102–120.
 37. *Matsuura M., Yamazaki Y., Sugiyama M. et al.* Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2003. — Vol. 1612. — P. 136–143.
 38. *Mercadal M., Domingo J. C., Petriz J. et al.* Preparation of immunoliposomes bearing poly(ethylene glucol)-coupled monoclonal antibody linked via a cleavable disulfide bond for ex vivo applications // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — Vol. 1509. — P. 299–310.
 39. *Metselaar J. M., Bruin P., de Boer L. W. et al.* A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating liposomes with effective drug-targeting capacity // *Bioconjug. Chem.* — 2003. — Vol. 14. — P. 1156–1164.
 40. *O'Shaughnessy J. A.* Pegylated liposomal doxorubicin in the treatment of breast cancer // *Clin. Breast Cancer.* — 2003. — Vol. 4. — P. 318–328.
 41. *Park J. W., Hong K., Kirpotin D. B. et al.* Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery // *Clin. Cancer Res.* — 2002. — Vol. 8. — P. 1172–1181.
 42. *Pastorino F., Brignole C., Marimpietri D. et al.* Doxorubicin-loaded Fab'-fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 86–92.
 43. *Sapra P., Allen T. M.* Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 7190–7194.
 44. *Sapra P., Moase E. H., Ma J. et al.* Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab'-fragments // *Clin. Cancer Res.* — 2004. — Vol. 10. — P. 1100–1111.
 45. *Schiffelers R. M., Koning G. A., Hagen T. et al.* Anti-tumor efficacy of tumor vasculature-targeted liposomal doxorubicin // *J. Control. Release.* — 2003. — Vol. 91. — P. 115–122.
 46. *Schiffelers R. M., Molema G., Hagen T.* Ligand-targeted liposomes directed against pathological vasculature // *J. Liposome Res.* — 2002. — Vol. 12. — P. 129–135.
 47. *Schnyder A., Krahenbuhl S., Torok M. et al.* Targeting of skeletal muscle in vitro using bitinylated immunoliposomes // *Biochim. J.* — 2004. — Vol. 377. — P. 61–67.
 48. *Schwonzen M., Kurbacher C. M., Mallmann P.* Liposomal doxorubicin and weekly paclitaxel in the treatment of metastatic breast cancer // *Anticancer Drugs.* — 2000. — Vol. 11. — P. 681–685.
 49. *Skubitz K. M.* Phase II trial of pegylated-liposomal doxorubicin (Doxil) in sarcoma // *Cancer Invest.* — 2003. — Vol. 21, No. 2. — P. 167–176.
 50. *Takeuchi H., Kojima H., Yamamoto H. et al.* Evaluation of circulation profiles of liposomes coated with hydrophilic polymers having different molecular weights in rats // *J. Control. Release.* — 2001. — Vol. 75. — P. 83–91.
 51. *Torchilin V. P., Klibanov A. L., Huang L. et al.* Targeted accumulation of polyethylene glucol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium // *FASEB J.* — 1992. — Vol. 6. — P. 2716–2719.
 52. *Torchilin V. P., Levchenko T. S., Lukyanov A. N. et al.* p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2001. — Vol. 1511. — P. 397–411.
 53. *Torchilin V. P., Levchenko T. S., Whiteman K. R. et al.* Amphiphilic poly-N-vinylpyrrolidones; synthesis, properties and liposome surface modification // *Biomater.* — 2001. — Vol. 22. — P. 3035–3044.
 54. *Waelti E., Wegmann N., Schwaninger R. et al.* Targeting HER-2/neu with antirat neu virosomes for cancer therapy // *Cancer Res.* — 2002. — Vol. 62. — P. 437–444.
 55. *Waterhouse J. E., Harbottle R. P., Keller M. et al.* Synthesis and application of integrin targeting lipopeptides in targeted gene delivery // *ChemBioChem.* — 2005. — Vol. 6. — P. 1212–1223.
 56. *Whiteman K. R., Subr V., Ulbrich K. et al.* Poly(HPMA)-coated liposomes demonstrate prolonged circulation in mice // *J. Liposome Res.* — 2001. — Vol. 11. — P. 153–164.
 57. *Wollina U., Dummer R., Brockmeyer N. H. et al.* Multicenter study of pegylated liposomal doxorubicin in patients with cutaneous T-cell lymphoma // *Cancer.* — 2003. — Vol. 98, No. 5. — P. 993–1001.
 58. *Xu L., Tang W., Huang C. et al.* Systemic p53 gene therapy of cancer with immunolipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv // *Molec. Med.* — 2001. — Vol. 7, No. 10. — P. 723–734.
 59. *Yuan F., Leunig M., Huang S. K. et al.* Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft // *Cancer Res.* — 1994. — Vol. 54, No. 13. — P. 3352–3356.
 60. *Zanten J., Doornbos-van der Meer B., Audouy S. et al.* A nonviral carrier for targeted gene delivery to tumor cells // *Cancer Gene Ther.* — 2004. — Vol. 11. — P. 156–164.

Поступила 30.01.2006.