



УДК 577.114.7:577.352.2:616-006

## ТРАНСПОРТИРОВКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЛИПОСОМ К ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМ КЛЕТКАМ С ПОМОЩЬЮ УГЛЕВОДНЫХ ДЕТЕРМИНАНТ

© 1998 г. Е. Л. Водовозова, С. В. Хайдуков, Г. П. Гаенко, Т. Н. Бондарчук,  
И. И. Михалев, И. В. Гречишникова, Ю. Г. Молотковский<sup>#</sup>

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 07.04.98 г. Принята к печати 20.04.98 г.

Разработан метод синтеза липофильных гликоконъюгатов (векторов) на основе полиэтиленгликольсодержащего детергента. С помощью проточной цитофлуориметрии показано, что флуоресцентномеченные липосомы, несущие  $\beta$ -галактозилный конъюгат, эффективнее связываются с клетками лейкоза человека HL-60, чем липосомы, снабженные  $\beta$ -глюкозилным конъюгатом или безвекторные липосомы. Синтезировано новое липидное производное противоопухолевого препарата рубомицина – *N*-(*rac*-1,2-диолеоилглицеро-3-оксалил)рубомицин. Липосомы, нагруженные этим липидным производным и оснащенные галактозилным вектором, проявили наибольшую цитотоксическую активность *in vitro*.

*Ключевые слова:* опухолевые клетки; лектины; неогликоконъюгаты; липосомы; цитотоксические препараты, липидные производные.

Липосомы в качестве системы для адресной доставки цитотоксических препаратов в организме предложены уже более 10 лет назад [1–3]. Уменьшение токсического воздействия агентов, заключенных внутрь липосом, на организм в целом происходит за счет уменьшения их концентрации в кровотоке и отличающегося по сравнению со свободными препаратами распределения между тканями и органами. Кроме того, известно, что липосомы среднего диаметра (100–150 нм) могут накапливаться в опухолях из-за характерных для них дефектов стенок капиллярных сосудов [4]. В области исследований по применению липосом как средств доставки лекарств в последние 3–4 года наблюдается новый подъем. Стимулом для этого явилось в первую очередь развитие метода получения *stealth*-липосом, т. е. липосом, защищенных от опсонизации и захвата клетками ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) полиэтиленгликольными (ПЭГ) цепями, полярными головками фосфатидилинозита или ганглиозидов [5], создающими на поверхности мембраны высокогидратированные стерические препятствия.

Было показано, что липосомы, содержащие ПЭГ-фосфатидилэтаноламин, гораздо менее эффективно по сравнению с незащищенными липосомами выводятся клетками РЭС, длительное время циркулируют в кровотоке и накапливаются в опухолевых участках тканей [6, 7]. В настоящее время уже проводятся клинические испытания ПЭГ-липосом, содержащих во внутреннем водном объеме противоопухолевый антибиотик доксорубин [8].

Однако остается ряд нерешенных вопросов. Во-первых, необходимо обеспечить направленный транспорт лекарственных липосом к злокачественным клеткам, что предполагает оснащение липосом специфическими лигандами. Во-вторых, такие лиганды должны облегчить связывание и слияние липосом с клетками, причем должны быть исследованы механизмы этих процессов, так как для лекарства в липосомной форме они отличаются от пассивного или активного трансмембранного переноса исходного препарата. И наконец, необходимо добиться более высокой эффективности “разгрузки” липосом после их интернализации клетками. Иными словами, после попадания в клетку стабилизированная липосома должна стать нестабильной. Недавно было показано, что липосомы, несущие конъюгат фолиевой кислоты с ПЭГ-фосфатидилэтаноламиновым носителем, проникают в опухолевые клетки путем эндоцитоза, опосредованного рецептором фолата на поверхности клеточной мем-

Сокращения: РЭС – ретикуло-эндотелиальная система; ПЭГ – полиэтиленгликоль; CL – карбоксилуброд; Gal $\beta$ -CL – конъюгат 3-аминопропил- $\beta$ -галактозида и карбоксилуброда; Glc $\beta$ -CL – то же для 3-аминопропил- $\beta$ -глюкозида; RubDG – *N*-(*rac*-1,2-диолеоилглицеро-3-оксалил)рубомицин; PBS – 0.01 M K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>-фосфатный буфер, pH 7.0, содержащий 0.15 M NaCl.

<sup>#</sup> Автор для переписки (e-mail: jgmol@ibch.siobc.ras.ru).

браны [9]. Однако содержимое водного объема липосом высвобождалось в эндосомах лишь на 5%. После встраивания в липосомы специального пептидного рН-чувствительного триггера этот показатель удалось увеличить до 20–25%.

Что касается повышения эффективности транспорта нагруженных лекарством липосом к клеткам злокачественных опухолей за счет специфических лигандов (векторов), то наибольшее число работ посвящено изучению применения иммунолипосом, т.е. липосом, снабженных моноклональными антителами к опухолевым клеткам [10, 11]. Причем уже исследуются иммунолипосомы, несущие моноклональные антитела на терминальном этиленгликольном звене ПЭГ-фосфатидилэтаноламиновых конъюгатов, что препятствует экранированию лиганда этими цепями [11].

Существует и другой подход, основанный на том, что клетки млекопитающих экспрессируют углеводсвязывающие белки – мембранные лектины [12]. Лектины были обнаружены на плазматической мембране многих нормальных и опухолевых клеток. Одна из основных их функций заключается в рецепции специфических гликоконъюгатов, участвующих в процессе эндоцитоза и других клеточных взаимодействиях [13]. Было показано, что трансформированные клетки экспрессируют лектины в гораздо большей степени, чем нормальные. Предполагается, что это явление играет существенную роль в процессе метастазирования [14]. Повышенную экспрессию лектинов было предложено использовать для диагностики рака [15], а также для нацеливания макромолекулярных носителей цитотоксических препаратов на опухолевые клетки с помощью углеводных лигандов [13]. Так, Монсиньи и др. [16] использовали неогликопротеин (гликозилированный бычий сывороточный альбумин) для доставки ковалентно связанного с ним метотрексата в трансформированные клетки.

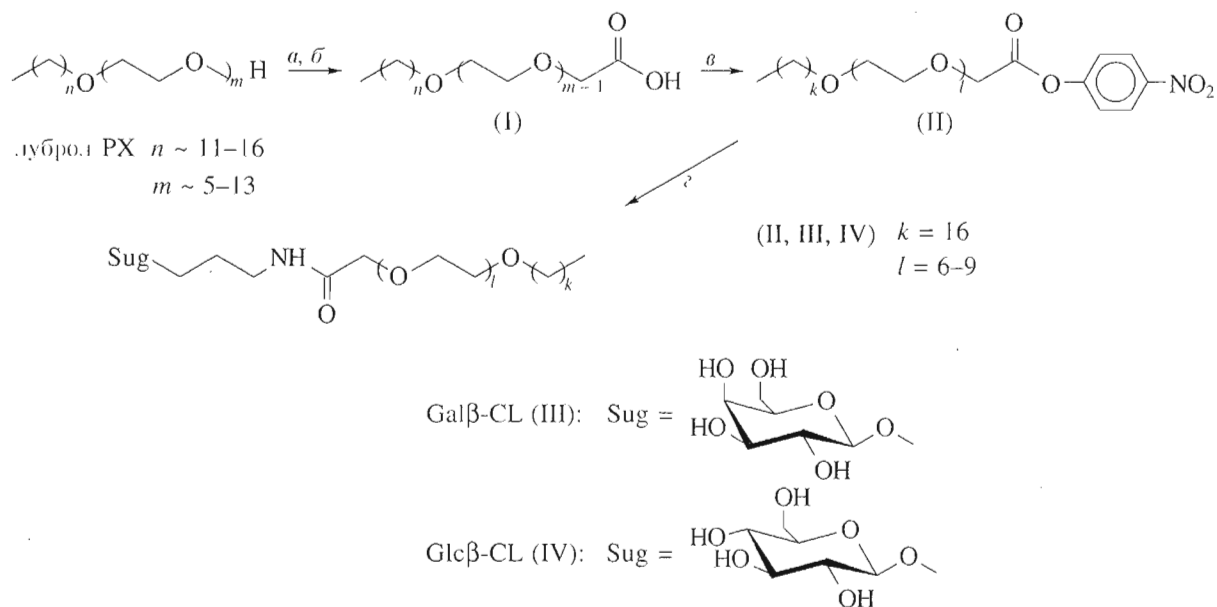
Мы показали, что липосомы, содержащие специфические липофильные гликоконъюгаты на основе полиакриламидной матрицы [17], связываются *in vitro* с клетками лейкоза человека HL-60 и аденокарциномы легкого человека на 50–80% эффективнее, чем липосомы без вектора или липосомы с неактивным лигандом [18]. В качестве последнего был использован остаток GlcNAc $\beta$ , который в составе конъюгата с ПАА-матрицей не обнаружил сродства к указанным клеткам в наших предварительных испытаниях. Кроме того, в литературе нет достаточно обоснованных данных о специфичности лектинов плазматических мембран клеток млекопитающих к концевым остаткам  $\beta$ -глюкозы или  $\beta$ -глюкозамина. После включения в мембрану липосом липидного производного противоопухолевого агента сарколизина – *rac*-1,2-диолеил-3-сарколизилглицерина

[19] – эти векторные липосомы проявили в 2–4 раза большую цитотоксическую активность в отношении указанных клеток лейкоза по сравнению с не имеющими вектора или несущими неактивный лиганд [18].

При исследовании противоопухолевых свойств на экспериментальных животных потребовались более высокие концентрации векторных цитотоксических липосом, чем в опытах *in vitro*. Оказалось, что в этих условиях липосомы с векторами на основе ПАА-матрицы нестабильны, за исключением варианта с конъюгированным остатком GlcNAc $\beta$ . На мышцах с экспериментальным лейкозом Р-388 [20] и аденокарциномой молочной железы [21] липосомы, нагруженные липидным производным сарколизина и несущие указанный лиганд, показали лучшие терапевтические свойства по сравнению не только с интактным сарколизинем, но и с цитотоксическими липосомами без гликоконъюгата. Можно предположить, что неактивный лиганд (вместе с ПАА-матрицей) защищает липосомы от быстрого выведения из кровотока путем образования гидрофильной оболочки на их поверхности.

Недавно появились сообщения о конструировании ПЭГ-защищенных липосом, содержащих конъюгированный с терминальным этиленгликольным звеном тетрасахарид *sialyl Lewis x* [22, 23], являющийся лигандом Е-селектина. Авторы показали, что такие липосомы на 3 порядка эффективнее, чем сам олигосахарид, ингибируют клеточную адгезию, опосредованную присутствием указанного лектина [22]. Известно, что за счет латеральной диффузии в мембране лиганды могут концентрироваться в зоне контакта липосомы с рецептором на поверхности клетки-мишени, образуя кластер, необходимый для эффективного мультивалентного взаимодействия. Кроме того, для обеспечения контакта с рецептором углеводные лиганды должны быть экспонированы на достаточном расстоянии над липосомной мембраной с помощью гидрофильного спейсера. Большей частью таким спейсером служит ПЭГ со степенью полимеризации около 46, и такая же длина ПЭГ-цепи необходима для защиты липосомы от опсонизации и клеток РЭС [5, 9, 22, 23]; данных же об эффективности интернализации и разгрузки указанных липосом клетками-мишенями пока мало.

Учитывая все изложенное, мы разработали синтез новых липофильных гликоконъюгатов – векторов, применив в качестве носителя модифицированный нами коммерческий детергент – луброл РХ (основной его компонент – простой гептадециловый эфир полиэтиленгликоля, степень полимеризации 7–9). Схема синтеза включает три стадии: 1) окисление терминальной гидроксигруппы луброла РХ перманганатом в щелочной



Реагенты: *a* –  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $100^\circ\text{C}$ ; *b* –  $\text{H}^+$ ; *v* – *n*-нитрофенилтрифторанетат, Py;  
*z* – 3-аминопропил- $\beta$ -гликозид, триэтиламин

Схема 1.

среде с образованием карбоксилуброла (CL); 2) получение *n*-нитрофенилового эфира CL; 3) конъюгация эфира CL с аминокпропилированными углеводами. С помощью флуоресцентного аналога таких конъюгатов – дансилуброла, полученного действием дансилхлорида на луброл PX в пиридине, методом гель-фильтрации мы показали, что данный алкил-ПЭГ-носитель хорошо удерживается в липидном бислое в необходимом для наших экспериментов интервале концентраций (данные не приведены). Надо отметить также, что получение дансилуброла позволило нам с помощью масс-спектрометрии определить соотношение различных молекулярных форм, составляющих исходный коммерческий детергент (см. выше). После получения *n*-нитрофенилового эфира (II) окисленного луброла (схема 1) колонной хроматографией на силикагеле выделяли самую высокомолекулярную фракцию. Масс-спектрометрический анализ полученного соединения (II) показал четыре основных компонента CL-носителя со степенью полимеризации ПЭГ 6, 7, 8, 9 и гептадецильным остатком (см. Эксперимент. часть). Для конечных продуктов – гликоконъюгатов (III) и (IV) – провести такой анализ, к сожалению, не удалось.

Известно, что галактозоспецифические лектины экспрессируются практически всеми животными клетками; это показали и наши данные для двух линий трансформированных клеток [18]. Поэтому в первую очередь в качестве положительного

контрольного вектора был получен CL-конъюгат галактозы (III). Аналогичный конъюгат глюкозы (IV) предназначался на роль неактивного контрольного лиганда; он же мог оказаться полезным (в дальнейших исследованиях) для защиты поверхности липосом от опсонизации.

Связывание липосом, несущих различные углеводные лиганды, с клетками HL-60 исследовали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Для этого липосомы, состоящие из смеси яичного фосфатидилхолина, холестерина, токоферола (69:30:1, моль/моль) и 2 мол. % гликоконъюгатов (III) или (IV), метили флуоресцентным мембранным зондом – олеоилпроламином 6G [24]. Липосомы формировали методом экструзии, их средний диаметр (120 нм) определяли по лазерному светорассеянию. На рис. 1 представлены данные, полученные при изучении кинетики связывания липосом различного состава с опухолевыми клетками. В течение первых 12 мин инкубации проводили непрерывное наблюдение за процессом связывания. Видно, что связывание клетками липосом, несущих Galβ-CL-конъюгат (кривая 1) идет с большей скоростью, чем в случае контрольных липосом без вектора (*κ*) или с Glcβ-лигандом (2). При этом Galβ-липосомы за 12 мин связываются с трансформированными клетками на 37% эффективнее, чем контрольные, и почти на 54%, чем Glcβ-липосомы. В этих же условиях липосомы, несущие Galβ-лиганд на ПАА-матрице, лишь на 6.5% эффективнее, чем контрольные



липосомы, связывались с опухолевыми клетками (данные не приведены). Через 4 ч инкубации уровень связанной с клетками флуоресценции для Gal $\beta$ -CL- и Glc $\beta$ -CL-липосом практически выравнивается (в среднем 11.0 и 10.1 усл. ед. флуоресценции соответственно) (таблица), при этом контрольные липосомы продолжают существенно отставать (7.24 усл. ед. флуоресценции). Возможно, постепенное нарастание связывания клетками липосом с Glc $\beta$ -вектором, которое хорошо проявляется к концу 4-часовой инкубации, может быть результатом активности белков, участвующих в углеводном обмене, например глюкозотранспортного белка (ср. [25]). Интересно, что в течение первых 30 мин инкубации уровень связывания с клетками Glc $\beta$ -липосом даже ниже, чем контрольных. Можно предположить, что концевая  $\beta$ -глюкоза является дополнительным препятствием для неспецифического связывания липосом с клетками.

Следующим этапом работы было конструирование липосом, нагруженных цитотоксическим препаратом и несущих углеводный лиганд. Липосомы, содержащие лекарственное средство в липидном бислое, обладают определенными преимуществами по сравнению с несущими действующее начало во внутреннем водном объеме: уменьшается утечка препарата как в процессе циркуляции в кровотоке, так и на стадии взаимодействия липосомы с клеткой, если предположить, что по крайней мере частично происходит не эндоцитоз, а слияние мембран. Механизм этого взаимодействия остается пока не выясненным, однако известно, что цитоплазматические мембраны трансформированных клеток отличаются повышенной жидкостью [26], что, очевидно, облегчает их слияние с липосомами. В последнее время число работ по синтезу и поиску активных липидных производных противоопухолевых препаратов (как правило, гидрофильных веществ) становится все больше. Например, были синтезированы новые липидные производные 5-фторуридина [11], 1- $\beta$ -D-арабинофуранозилцитозина [27], адриамицина [28].

Ранее синтезированное нами липидное производное рубомицина (даунорубицина) – N-(rac-1,2-диолеоилглицеро-3-малонил)рубомицин [19] – в липосомной форме не проявило цитотоксической активности в культуре клеток HL-60. Очевидно, амидная связь между аминогруппой рубомицина и малонильным остатком не расщепляется клеточными ферментами с высвобождением исходного цитотоксического агента. Поэтому нами был предпринят синтез нового производного – N-(rac-1,2-диолеоилглицеро-3-оксалил)рубомицина (RubDG) (VI) (схема 2). Продукт получали, вводя в реакцию рубомицин с 1,2-диолеоилглицеро-3-оксалилхлоридом (V) в присутствии триэтиламина. Соединение (V) синтезировали из 1,2-ди-

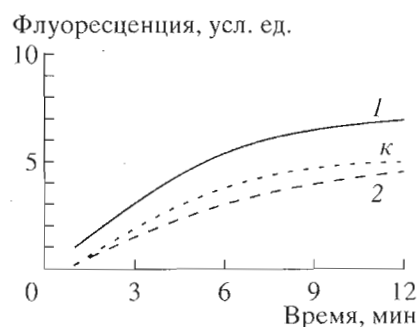


Рис. 1. Кинетика связывания флуоресцентномеченых Gal $\beta$ -CL- (1) и Glc $\beta$ -CL- (2) липосом с клетками HL-60, к – безвекторные липосомы. Приведены типичные зависимости флуоресценции клеток (в усл. ед.) от времени инкубации с липосомами, полученные при непрерывном наблюдении за процессом на проточном цитофлуориметре.

олеоилглицерина и избытка оксалилхлорида, полученный несимметричный хлорангидрид использовали в последующей реакции без очистки. Новое производное рубомицина, по результатам гель-фильтрации, достаточно эффективно (2.5 мол. % от матричных липосомных липидов) встраивалось в мембрану липосом, полученных методом ультразвуковой дезинтеграции. Размер полученных липосом, определенный методом лазерного светорассеяния, составил в среднем 130 нм. Липосомная форма RubDG показала лучшие по сравнению с исходным рубомицином терапевтические свойства при испытаниях на экспериментальных мышцах с аденокарциномой молочной железы [21].

Для изучения влияния углеводных лигандов на взаимодействие цитотоксических липосом с опухолевыми клетками *in vitro* были получены липосомы, содержащие 2.5 мол. % RubDG и 2 мол. % Gal $\beta$ -CL, Glc $\beta$ -CL или луброла PX. Результаты определения цитотоксической активности различных липосом после инкубации с клетками HL-60 в течение суток представлены на рис. 2. Сами по се-

Кинетика связывания флуоресцентномеченых липосомом с клетками HL-60\*

Время инкубации, ч	Липосомы		
	безвекторные	содержащие	
		Gal $\beta$ -CL	Glc $\beta$ -CL
0.5	4.46	5.20	4.12
1	5.04	7.23	5.92
2	5.72	9.39	7.92
4	7.24	11.0	10.1

\* Среднестатистическая величина интенсивности флуоресценции клеток (усл. ед.) после инкубации с липосомами.



**Рис. 2.** Цитотоксические свойства интактного рубомицина (а), безвекторных липосом (б), Gal $\beta$ -CL-липосом (в), безвекторных RubDG-липосом (г), (Glc $\beta$ -CL,Rub-DG)-липосом (д), содержащих луброл RubDG-липосом (е) и (Gal $\beta$ -CL,RubDG)-липосом (ж). Количество живых клеток (%) рассчитывали по формуле: (количество живых клеток в опыте / количество живых клеток в контроле)  $\times$  100. Контроль – клетки, инкубированные с аликвотой PBS.

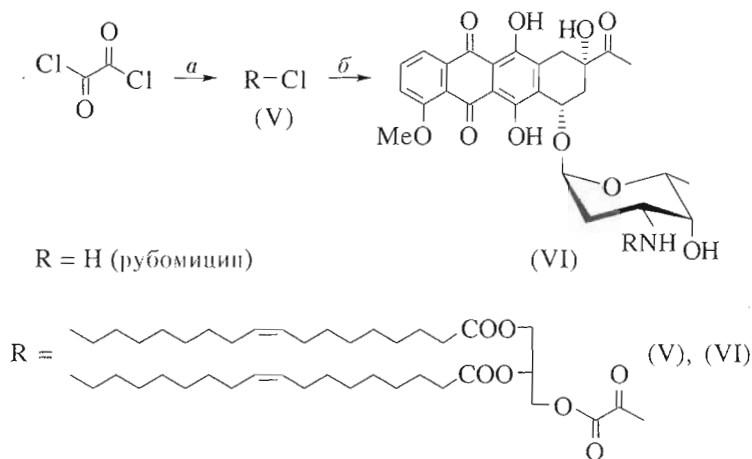
бе липосомы из матричных липидов и липосомы, несущие положительный вектор Gal $\beta$ -CL, мало влияли на жизнеспособность клеток лейкоза (рис. 2, б, в). Безвекторные липосомы, нагруженные RubDG, заметно уменьшали количество живых клеток по сравнению с контролем (г), хотя и слабее, чем исходный антибиотик (а). Несомненно, липидное производное рубомицина с оксалильным спейсером (RubDG) в отличие от производного с малонильным остатком (см. выше) расщепляется эндогенными эстеразами и образует легкогидролизующийся несимметричный оксалиламид, далее высвобождающий рубомицин. Цитотоксические липосомы, снабженные неактивным Glc $\beta$ -CL-конъюгатом (рис. 2, д) или про-

сто негликозилированным лубролом (е) влияли на процент живых клеток практически так же, как и цитотоксические липосомы (г). И наконец, цитотоксические липосомы, несущие положительный вектор Gal $\beta$ -CL (ж), на ~30% эффективнее, чем безвекторные, подавляли выживаемость и пролиферацию опухолевых клеток.

Таким образом, новые липофильные гликоконъюгаты на основе полиэтиленгликольсодержащего детергента дают возможность увеличить эффективность взаимодействия цитотоксических липосом с трансформированными клетками, что открывает новые перспективы в области направленной доставки лекарств в противоопухолевой терапии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В синтезах использовали аминопропилированные гликозиды Gal $\beta$  и Glc $\beta$ , любезно предоставленные фирмой Syntesome GmbH (Мюнхен, Германия); гидрохлорид рубомицина отечественного производства был предоставлен А.М. Козловым (Онкологический научный центр РАМН); луброл PX (Sigma, США), сухой пиридин, DMSO и дансилхлорид (Merck, ФРГ); D, L- $\alpha$ -токоферол (Serva, ФРГ); трифторуксусный ангидрид, оксалилхлорид и триэтиламин (Fluka, Швейцария); холестерин (Calbiochem-Behring, США) перекристаллизован из метанола. Остальные реактивы и растворители ("Реахим", Россия) использовали после обычной очистки. *rac*-1,2-Диолеилглицерин синтезировали из олеилхлорида и *rac*-1-третилглицерина [29]. *n*-Нитрофенилтрифторацетат получали из *n*-нит-



Реагенты: а – *rac*-1, 2-диолеилглицерин, диизопропилэтиламин;  
б – рубомицин, диизопропилэтиламин

**Схема 2.**



рофенола и трифторуксусного ангидрида [30]. Олеилпродамин синтезирован как описано [24].

Для колоночной хроматографии применяли силикагель 60 (40–63 мкм; Merck), силикагель L (40–100 мкм; Chemapol, Чехия) и силикагель 100 (63–200 мкм; Merck), для гель-фильтрации – сефадексы LH-20 и G-50 “fine” (Pharmacia, Швеция), для ТСХ – пластинки Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) в системах толуол–этилацетат–СН<sub>3</sub>СООН, 50:10:1 (А); хлороформ–изопропанол–СН<sub>3</sub>СООН, 100:10:1 (Б); изопропанол–этилацетат–вода, 2:3:1 (В); хлороформ–изопропанол–7 н. NH<sub>4</sub>ОН, 100:10:1 (Г); хлороформ–изопропанол, 100:5 (Д); пентан–диэтиловый эфир, 4:1 (Е); толуол–хлороформ–изопропанол, 10:10:1 (Ж); обнаружение с помощью фосфорномолибденовой кислоты (а), УФ-облучения (б), паров аммиака (в) и прогрева с 7% Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub> (г) и визуально (д). Упаривание проводили в вакууме при температуре не выше 40°C.

УФ-спектры регистрировали на спектрофотометре LKB Ultrospec II (Швеция) в этаноле, спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Hitachi F-4000 (Япония), масс-спектры – на приборе МСВХ (временноточный масс-спектрометр с ионизацией продуктами деления калифорния-252 при ускоряющем напряжении +15 эВ) (г. Сумы, Украина), спектры <sup>1</sup>Н-ЯМР – на спектрометре Bruker WM 500 (США).

**Карбоксилуброл (СL, I).** К раствору луброла РХ (3 г, ~5 ммоль) в 70 мл воды добавляли 5 мл 6% КОН, затем в смеси растворяли 4 г КМnO<sub>4</sub> и выдерживали 15 ч при 100°C. Смесь фильтровали, подкисляли фильтрат 6 н. НСl до рН 2.0 и экстрагировали хлороформом (3 × 50 мл). Экстракт упаривали и высушивали при 20 Па. Полученный в виде бесцветной вязкой жидкости продукт (2.7 г) использовали без дополнительной очистки.

**n-Нитрофениловый эфир карбоксилуброла (II).** К 2.7 г окисленного луброла (I) прибавляли раствор n-нитрофенилтрифторацетата (1.76 г, 7.5 ммоль) в 6 мл пиридина, перемешивали 1 ч при комнатной температуре и выдерживали еще 12 ч. Реакционную смесь упаривали и наносили на колонку с сефадексом LH-20 (1 × 100 см), уравновешенную смесью хлороформ–метанол, 1:1. Объединяли фракции, содержащие высокомолекулярные формы эфира (II); контроль ТСХ (А,Б; а,б,в). После упаривания получали ~1 г маслообразного продукта, содержащего также исходный окисленный луброл. Продукт хроматографировали на колонке с силикагелем L, элюируя смесью хлороформ–изопропанол–вода, 100:1:0.05. Получали 224 мг эфира (II) в виде желтого маслообразного вещества, индивидуального хроматографически, R<sub>f</sub> 0.75 (Б; а,б,в). Масс-спектр, m/z: 721.7 [M + Na]<sup>+</sup>; 766.8 [M + Na]<sup>+</sup>; 811.5 [M + Na]<sup>+</sup>; 856.3 [M + Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>Н-ЯМР (С<sup>2</sup>Н<sub>3</sub>О<sup>2</sup>Н, δ, м.д.): 1.09 (т, 3Н,

J 7 Гц, СН<sub>3</sub>); 1.48 (ушир. м, ~28 Н, СН<sub>2</sub>); 1.74 (м, 2Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>); 3.64 (т, 2Н, J 6 Гц, ОСН<sub>2</sub>); 3.82 (м, ~24 Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>О); 4.70 (с, 2Н, ОСН<sub>2</sub>СО); 7.55 и 7.63 (ОС<sub>6</sub>Н<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>).

**Galβ-CL (III).** 3-Аминопропил-β-галактопиранозид (9.5 мг, 40 мкмоль) растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида, прибавляли 10 мкл триэтиламина и раствор 30 мг n-нитрофенилового эфира (II) (~42 мкмоль) в 200 мкл DMSO. Реакционную смесь перемешивали и выдерживали при комнатной температуре до полной конверсии углевода (3 ч), контроль – ТСХ (Д; а,в,г). Прибавляли к реакционной смеси 20 мкл воды (для разложения следов n-нитрофенилового эфира), 500 мкл смеси хлороформ–метанол, 1:1, и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом LH-20 (1 × 100 см), элюируя смесью хлороформ–метанол, 1:1. Получили 27 мг (87%) гликоконъюгата (III) в виде бесцветного аморфного вещества, R<sub>f</sub> 0.36 (Д; а,г). <sup>1</sup>Н-ЯМР (С<sup>2</sup>Н<sub>3</sub>О<sup>2</sup>Н, δ, м.д.): 1.09 (т, 3Н, J 7 Гц, СН<sub>3</sub>); 1.49 (ушир. м, СН<sub>2</sub>); 1.76 (м, 2Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>); 2.03 (м, 2Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н); 3.58 (м, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н); 3.656 (т, 2Н, J 6.5 Гц, ОСН<sub>2</sub>); 3.66 (дд, 1Н, Н3 Gal); 3.69 (м ~ т, 1Н, Н5 Gal), 3.71 (дд, 1Н, J<sub>3</sub> 10 Гц, Н2 Gal); 3.83 (м, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>О, ОСНСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н); 3.91 (дд, 1Н, J<sub>6</sub> 11 Гц, J<sub>5</sub> 5 Гц, Н6 Gal); 3.95 (дд, 1Н, J<sub>5</sub> 7 Гц, Н6' Gal); 4.02 (д, 1Н, J<sub>3</sub> 3 Гц, Н4 Gal); 4.15 (м, 1Н, ОСН'СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н); 4.18 (с, 2Н, СОСН<sub>2</sub>О); 4.40 (д, 1Н, J<sub>2</sub> 7.7 Гц, Н1 Gal).

**Glcβ-CL (IV).** Синтезировали аналогично гликоконъюгату (III) из 7 мг 3-аминопропил-β-глюкопиранозиды и 41 мг n-нитрофенилового эфира (II) в присутствии 7 мкл триэтиламина. Получали 19 мг (81%) гликоконъюгата (IV), R<sub>f</sub> 0.36 (Д; а,г). <sup>1</sup>Н-ЯМР (С<sup>2</sup>Н<sub>3</sub>О<sup>2</sup>Н, δ, м.д.): 1.09 (т, 3Н, J 7 Гц, СН<sub>3</sub>); 1.48 (ушир. м, СН<sub>2</sub>); 1.76 (м, 2Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>); 1.97 (м, 2Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н); 3.37 (дд, 1Н, J<sub>3</sub> 8.7 Гц, Н2 Glc); 3.52 (м, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н, Н4,5 Glc); 3.54 (т, 1Н, J<sub>4</sub> 8.5 Гц, Н3 Glc); 3.65 (т, 2Н, J 6 Гц, ОСН<sub>2</sub>); 3.83 (м, ОСНСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н, ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>О, Н6 Glc); 4.06 (дд, 1Н, J<sub>6</sub> 11.5 Гц, J<sub>5</sub> < 2 Гц, Н6' Glc); 4.12 (м, 1Н, ОСН'СН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>Н); 4.44 (д, 1Н, J<sub>2</sub> 8 Гц, Н1 Glc).

**Дансиллуброл.** Луброл РХ (30 мг, ~0.05 ммоль) растворяли в 1 мл пиридина, охлаждали до 0°C на бане со льдом и при перемешивании добавляли по каплям раствор дансилхлорида (27 мг, 0.1 ммоль) в 1 мл пиридина. Реакционную смесь перемешивали еще 2 ч при той же температуре, контролируя ход реакции ТСХ (Г; б), упаривали, остаток растворяли в 5 мл хлороформа, промывали водой (3 × 2 мл) и упаривали. Остаток растворяли в 1 мл смеси хлороформ–метанол (1:1) и наносили на

колонку с сефадексом LH-20 (1 × 100 см), уравновешенную той же системой. Фракции, содержащие продукт, хроматографировали на колонке с силикагелем (40–63 мкм), элюируя градиентом смеси изопропанол–7 н. NH<sub>4</sub>OH, 10:1, в хлороформе (1–10%). Получали 12 мг (~30%) желтоватого маслообразного вещества, индивидуального хроматографически в системе Г (б),  $R_f$  0.71, и разделяющегося на 7 молекулярных видов, представленных в неравных количествах, в системе Д (б). Масс-спектр,  $m/z$  (%): 603.5 [M]<sup>+</sup> (5.0); 647.3 [M]<sup>+</sup> (12.4); 690.4 [M]<sup>+</sup> (16.3); 734.7 [M]<sup>+</sup> (16.7); 778.7 [M]<sup>+</sup> (15.3); 823.1 [M]<sup>+</sup> (10.7); 867.2 [M]<sup>+</sup> (10.6); 912.5 [M]<sup>+</sup> (7.6); 957.7 [M]<sup>+</sup> (5.4). 0.96 (τ, 3H, J 7 Гц, CH<sub>3</sub>); 1.32 (ушир. м, CH<sub>2</sub>); 1.63 (м, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 2.90 (с, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>); 3.48 (τ, 2H, OCH<sub>2</sub>); 3.65 (м, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O); 4.16 (τ, 2H, CH<sub>2</sub>OSO<sub>2</sub>); 7.20; 7.54; 8.26; 8.58 (д, м, т, д, 6H, H<sup>2'</sup>-H<sup>4'</sup>, H<sup>6'</sup>-H<sup>8'</sup>). Спектр флуоресценции (в этаноле):  $\lambda_{\text{возб}}$  330 нм;  $\lambda_{\text{исп}}$  523 нм.

**rac-1,2-Диолеилглицеро-3-оксалилхлорид (V).** К раствору 70 мкл (800 мкмоль) хлористого оксалила в 3 мл сухого хлороформа, охлажденного до –10°C, при перемешивании по каплям прибавляли 44.9 мг (72 мкмоль) диолеилглицерина и 12.5 мкл (73.6 мкмоль) диизопропилэтиламина в 5 мл толуола. Реакционную смесь перемешивали еще 30 мин при комнатной температуре, контролируя ход реакции ТСХ (Е; а), и удаляли непрореагировавший хлористый оксалил упариванием. Полученный продукт (48.5 мг в виде желтоватого масла) использовали далее без дополнительной очистки.

**N-(rac-1,2-Диолеилглицеро-3-оксалил)рубомидин (VI).** К раствору 40 мг (70.9 мкмоль) гидрохлорида рубомидина и 36 мкл (216 мкмоль) диизопропилэтиламина в 2.5 мл сухого хлороформа при перемешивании прибавляли 48.5 мг (70.9 мкмоль) хлорангидрида (V) в 2.4 мл хлороформа. Через 1.5 ч реакционную смесь промывали водой (2 × 4 мл), насыщ. NaCl и сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Хроматографией на колонке с силикагелем 100 в ступенчато-градиентной системе толуол–хлороформ–изопропанол (2:1:0.1–1:2:0.2–1:1:0.2) выделяли 8.8 мг (10%) соединения (VI) в виде красного масла,  $R_f$  0.38, (Ж; а,б,д). УФ-спектр,  $\lambda_{\text{max}}$ , нм (ε): 252 (52000), 290 (8750).

**Липосомы.** Липидные пленки готовили из смеси матричных липидов – яичный фосфатидилхолин–холестерин–D, L-α-токоферол, 69:30:1 (мол. соотношение), +0.5 мол. % олеилродамина 6G или 2.5 мол. % производного (VI) и 2 мол. % гликоконъюгата (III) или (IV). Флуоресцентномеченные липосомы формировали экструзией: липидную пленку диспергировали в PBS (суммарная концентрация липидов ~1.2 мг/мл) с помощью обработки 30 мин при комнатной температуре на ультразвуковой бане, полученную суспензию по-

следовательно пятикратно продавливали через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размерами пор 400, 200 и 100 нм в ячейке для ультрафильтрации (N<sub>2</sub>, 4 ат). Для приготовления цитотоксических липосом липидную пленку диспергировали в PBS встряхиванием и подвергали ультразвуковой дезинтеграции титановым шупом (22 кГц, 100 Вт; 3 × 3 мин, с интервалами в 1 мин) при 37°C в атмосфере аргона; полученные липосомные дисперсии освобождали от титановой пыли центрифугированием (10000 g, 10 мин) и стерилизовали фильтрованием через поликарбонатный фильтр (400 нм). Размеры липосом определяли по лазерному светорассеянию на приборе Coulter Model N4 MD Sub-Micron Particle Analyzer (Coulter Electronics Inc., США).

**Клетки.** Миелоидные клетки лейкемии человека HL-60 культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в среде RPMI-1640 с добавлением 2 mM L-глутамин, 1 ед./мл пенициллина G, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% телячьей эмбриональной сыворотки (инактивированной нагреванием) (Gibco, Великобритания) и пассировали 2 раза в неделю. Для экспериментов использовали клетки (10<sup>6</sup>/мл), находящиеся в логарифмической фазе роста.

**Проточная цитофлуориметрия.** Анализ флуоресценции клеток (не менее 5000) проводили на лазерном проточном цитофлуориметре EPICS "Elite" (Coulter Electronics, США). Для дискриминации из зоны анализа частиц, не соответствующих по размерам и гранулярности живым клеткам, вводили логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малому углу и 90°-ному светорассеянию и результаты подвергали математической обработке с использованием программы MultiGraph и IMMUNO 4 (Coulter Electronics). Эксперименты проведены 2 раза.

**Определение цитотоксической активности.** Клетки инкубировали 24 ч с векторными липосомами, содержащими производное рубомидина (VI), или с самим рубомидином в той же концентрации (45 мкМ). Аналогичным образом клетки обрабатывали нецитотоксическими или безвекторными RubDG-липосомами. Контрольные клетки инкубировали с аликвотой PBS. Количество живых клеток определяли стандартным тестом с трипановым синим. Эксперименты проводили 6 раз, каждый в трех повторах.

Авторы выражают благодарность А.Б. Тузинову (ИБХ РАН) за ценные рекомендации при выполнении синтеза гликоконъюгатов и помощь в интерпретации спектров <sup>1</sup>H-ЯМР, а также А.М. Козлову (Онкологический научный центр РАМН), предоставившему рубомидин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-48421) и Государственной программы "Новейшие методы биоинженерии".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lasic D.D. // *Liposomes: from Physics to Applications*. Amsterdam: Elsevier, 1993. P. 262–471.
2. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. // *Science*. 1995. V. 267. P. 1275–1276.
3. Piste G., Kirsh R., Bugelski P. // *Novel Approaches to Cancer Chemotherapy* / Ed. P.S. Sukara. N.Y.: Acad. Press, 1984. P. 166–230.
4. Gabizon A., Papahadjopoulos D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 6949–6953.
5. Woodle M.C., Lasic D.D. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992. V. 905. P. 171–199.
6. Wu N.Z., Da D., Rudoll T.L., Needham D., Whorton A.R., Dewhurst M.W. // *Cancer Res*. 1993. V. 53. P. 3765–3770.
7. Yuan F., Leunig M., Huang S.K., Berk D.A., Papahadjopoulos D., Jain R.K. // *Cancer Res*. 1994. V. 54. P. 3352–3356.
8. Uziely B. // *J. Clin. Oncol*. 1995. V. 13. P. 1777–1785.
9. Vogel K., Wang S., Lee R.J., Chmielewski J., Low P.S. // *J. Am. Chem. Soc*. 1996. V. 118. P. 1581–1586.
10. Nassander U.K., Steerenberg P.A., Poppe H., Storm G., Poels L.G., De Jong W.H., Crommelin D.J.A. // *Cancer Res*. 1992. V. 52. P. 643–653.
11. Crosasso P., Brusa P., Dosio F., Arpicco S., Pacchioni D., Schuber F., Cattell L. // *J. Pharm. Sci*. 1997. V. 86. P. 832–839.
12. Goldstein I.J., Hugues R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N. // *Nature*. 1980. V. 285. P. 66.
13. Monsigny M., Roche A.-C., Midoux P., Mayer R. // *Adv. Drug. Deliv. Rev*. 1994. V. 14. P. 1–24.
14. Gabius H.-J. // *Cancer Invest*. 1987. V. 5. P. 39–46.
15. Bovin N.V. // *Lectins and Glycobiology* / Ed. H.-G. Gabius. Stuttgart: Springer-Verlag, 1993. P. 23–30.
16. Monsigny M., Roche A.-C., Midoux P. // *Biol. Cell*. 1984. V. 51. P. 187–196.
17. Бовин Н.В. // *Биоорг. химия*. 1996. Т. 22. С. 643–663.
18. Vodovozova E.L., Gayenko G.P., Razinkov V.I., Korchagina E.Yu., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. // *Biochem. Mol. Biol. Int*. 1998. V. 44. P. 543–553.
19. Водовозова Е.Л., Никольский П.Ю., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // *Биоорг. химия*. 1996. Т. 22. С. 548–556.
20. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Сыркин А.Б. // *Бюлл. экпер. биол. мед*. 1997. Т. 123. С. 439–441.
21. Moiseeva E.V., Vodovozova E.L., Mikhalyov I.I., Molotkovsky J.G. // *Mouse Genome*. 1997. V. 95. P. 895–897.
22. DeFrees S.A., Phillips L., Guo L., Zalipsky S. // *J. Am. Chem. Soc*. 1996. V. 118. P. 6101–6104.
23. Zalipsky S., Mullah N., Harding J.A., Gittelman J., Guo L., DeFrees S.A. // *Bioconjugate Chem*. 1997. V. 8. P. 111–118.
24. Молотковский Ю.Г. // *Биоорг. химия*. 1991. Т. 17. С. 976–980.
25. Feugeas J.-P., Néel D., Goussault Y., Derappe C. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. V. 1066. P. 59–62.
26. Shinitzky M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1984. V. 738. P. 251–261.
27. Schwendener R.A., Schott H. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 1996. V. 122. P. 723–726.
28. Hodoshima N., Udagawa C., Ando T., Fukuyasu H., Watanabe H., Nakabayashi S. // *Int. J. Pharm*. 1997. V. 146. P. 81–92.
29. Молотковский Ю.Г., Никулина Л.Ф., Бергельсон Л.Д. // *Химия природ. соед*. 1969. №4. С. 210–214.
30. Sakakibara S., Inukai N. // *Bull. Chem. Soc. Jpn*. 1964. V. 37. P. 1231–1232.

## The Transport of Cytotoxic Liposomes to Malignant Cells by Means of Carbohydrate Determinants

E. L. Vodovozova, S. V. Khaidukov, G. P. Gaenko, T. N. Bondarchuk, I. I. Mikhalev, I. V. Grechishnikova, and Jul. G. Molotkovsky<sup>#</sup>

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

A method of the synthesis of lipophilic glycoconjugates (vectors) on the basis of polyethyleneglycol-containing detergent was proposed. It has been shown by flow cytofluorometry that fluorescent labeled liposomes equipped with  $\beta$ -galactosyl conjugate are bound human leukemia HL-60 cells more effectively than liposomes embedded with the  $\beta$ -glucosyl conjugate or vector-free liposomes. A new lipid derivative of antitumor drug rubomycin (daunorubicin), *N*-(*rac*-1,2-dioleoylglycero-3-oxalyl)rubomycin (RubDG) has been synthesized. Liposomes loaded with RubDG and equipped with galactosyl vector showed higher cytotoxic activity *in vitro* against HL-60 cells than analogous unvectored liposomes or liposomes bearing glucosyl conjugate.

*Key words:* tumor cells, lectins, neoglycoconjugates, liposomes, cytotoxic drug lipid derivatives

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; e-mail: jgmol@ibch.siohc.ras.ru.