

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Третьякова Дарья Сергеевна

**Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные
препараты в бислое, с компонентами плазмы крови**

специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Водовозова Елена Львовна

Москва - 2020

Оглавление

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы.....	15
2.1. Влияние параметров наночастиц на взаимодействие с белками плазмы крови.....	15
2.2. Основные компоненты белковой короны липосом и последствия их сорбции.....	24
2.3. Взаимодействия липосом и компонентов белковой короны с клетками крови.....	34
2.4. Методы изучения белковой короны	41
2.5. Заключение.....	46
3. Материалы и методы.....	48
3.1. Материалы.....	48
3.2. Методы	52
3.2.1. Синтез липофильного производного метотрексата.....	52
3.2.2. Получение липосом	54
3.2.3. Инкубация липосом с цельной кровью, подготовка образцов для цитометрии.....	56
3.2.4 Проточная цитометрия.....	56
3.2.5. Инкубации липосом с плазмой и выделение липосом-белковых комплексов	57
3.2.6. Делипидизация белковых фракций и электрофорез в ПААГ	58
3.2.7. Иммуноблоттинг	58
3.2.8. Измерение гидродинамического диаметра и концентрации липосом ..	59
3.2.9. Измерение ζ -потенциала.....	60
3.2.10. Флуоресцентная спектроскопия для изучения стабильности липосом	61
3.2.11. Расчеты на основании интенсивностей сигналов флуоресценции	61
3.2.12. Оценка удерживания пролекарства MlphDG в бислое.....	63
3.2.13. ИК-спектроскопия липосом-белковых комплексов.....	64

4. Результаты и их обсуждение	65
4.1. Липосомы с липофильным пролекарством метотрексата.....	65
4.1.1. Синтез пролекарства метотрексата	65
4.1.2. Исследование путей активации системы комплемента МТХ- липосомами.....	66
4.1.3. Исследование влияния экранирующих компонентов в мембране МТХ- липосом на взаимодействие с лейкоцитами	71
4.2. Липосомы с липофильным пролекарством мелфалана.....	79
4.2.1. Характеристика липосом.....	79
4.2.2. Исследование влияния экранирующих компонентов в мембране на стабильность М ₁ рн-липосом в сыворотке крови	81
4.2.2.1. Вытекание кальцеина из липосом	81
4.2.2.2. Изучение целостности бислоя с использованием FRET-пары фосфолипидных зондов.....	85
4.2.2.3. Исследование удерживания пролекарства в бислое липосом	88
4.2.2.4. Изучение взаимодействий альбумина с липосомами с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье	90
4.2.3. Исследование эффектов липидного конъюгата полиэтиленгликоля в липосомах с пролекарством мелфалана.....	100
5. Заключение.....	107
6. Выводы	109
7. Список сокращений и условных обозначений	110
8. Список литературы.....	113
9. Приложения	143
Приложение 1. Каскад реакций системы комплемента.....	143
Приложение 2. Схема расщепления компонента С3	146

1. Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Проблема создания лекарственных средств, способных направленно действовать на больные органы и ткани, не вызывая при этом нежелательные побочные эффекты на уровне организма в целом, занимает особое место в онкологии, поскольку подавляющее большинство противоопухолевых средств обладает высокой системной токсичностью. Одним из наиболее рациональных подходов к уменьшению общей токсичности представляется использование супрамолекулярных носителей лекарств. Сама концепция систем доставки лекарств появилась еще в начале 1970-х гг. с первыми работами английского биохимика Грегори Грегориадиса по включению ферментов в липосомы — везикулы, мембрана которых построена из одного или нескольких липидных бислоев [1], [2]. Но потребовалось еще более 20 лет исследований и борьбы мнений в научном мире, чтобы подтвердить принципиальную возможность применения липосом в качестве носителей лекарств и разработать технологии получения липосомальных препаратов. Появление в 1995 г. первого одобренного к применению в клинике противоопухолевого препарата на основе липосом (Doxil®) фактически совпало с началом развития новой отрасли науки — наномедицины, «изучающей поведение и свойства материалов, частицы которых имеют нанометровые размеры» [3]. Заключение цитостатических агентов в наноразмерный носитель позволяет понизить их системную токсичность, обеспечить усиленное поглощение целевой тканью, защитить лекарство от нецелевых взаимодействий с биомолекулами и преждевременного разложения, и, кроме того, преодолеть развитие множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, связанной с флипазной активностью интегральных белков семейства ABC (ATP-binding cassettes), выводящих ксенобиотики из клеток. В основе накопления частиц размерами примерно 50–150 нм в опухолях и очагах воспаления путем экстравазации лежит дефектная структура образующейся *de*

novo сосудистой системы — повышенная проницаемость капилляров и нарушенный лимфатический дренаж в опухоли, так называемый эффект повышенной проницаемости и удерживания (enhanced permeability and retention, EPR) [4]. В ряде случаев, в экспериментальных моделях концентрация полимерных конъюгатов лекарств в опухоли превышала в 10-200 раз концентрацию в нормальных тканях и органах [5]. Правда, весьма грубый статистический анализ данных доклинических исследований, опубликованных за 10 лет (более 200 статей), показал, что в среднем лишь 1 % от введенной дозы наночастиц накапливается в солидных опухолях [6]. Поэтому предлагаются различные стратегии повышения эффективности доставки наночастиц в опухоли за счет эффекта EPR, основанные на предварительном модулировании васкуляризации опухоли. К ним относятся фармакологические (вазодилататоры) и физические методы локального воздействия (гипертермия, радиотерапия, сонопорация, фотодинамическая терапия) [7]. Однако следует отметить, что вопрос о токсичности наноматериалов приобретает первостепенное значение.

Среди известных наноносителей липосомы, построенные из природных фосфолипидов, отличаются наибольшей био- и гемосовместимостью и, следовательно, более всего подходят для введения в ослабленный организм пациента онкологической клиники. Более того, фосфолипиды сами обладают полезной фармакологической активностью. Именно поэтому первыми нанолекарствами, одобренными к применению в клинике, стали препараты на основе липосом [8]. Благодаря амфифильной природе липидов, в липосомальные системы доставки можно заключать лекарства, имеющие различную растворимость в воде: гидрофобные молекулы обладают сродством к бислою, а для гидрофильных доступен внутренний водный объем. На мировом рынке наномедицинских препаратов, предназначенных для системного введения, средства на основе липосом занимают лидирующую позицию [9], значительно обгоняя такие известные препараты как, например, Taxol (эмульсия цитостатика паклитаксела, стабилизированная фармакопейным детергентом CremophorEL) или

Abraxane (наночастицы паклитаксела, стабилизированные альбумином). В лечении онкологических больных с помощью липосомальных препаратов достигнуты серьезные успехи [10]. В качестве систем доставки лекарств были разработаны и коммерчески доступны в настоящее время липосомы и липидные комплексы для применения в различных областях медицины: для химиотерапии в онкологии (Doxil[®], Myocet[®], Onivide[™], Depocyt[®] и др.), для фотодинамической терапии в офтальмологии (Visudyne[®]), для борьбы с заболеваниями грибковой природы (Ambisome[®], Amphotec[®], Abelcet[®]), для вакцинации (Eraphal[®], Inflexal[®] V) и обезболивания длительного действия, до 72 ч (DepoDur[™], Exparel[®]). Ещё большее количество липосомальных препаратов проходит клинические исследования [11].

Поскольку липосомы предназначены для введения в кровотоки, их взаимодействие с компонентами крови является первым физиологическим барьером на пути к целевым клеткам и тканям. При контакте с плазмой крови липосомы, как и другие наночастицы, быстро покрываются белками и их комплексами с липидами. На их поверхности формируется так называемая биомолекулярная корона. Основное внимание исследователей уделялось её белковым компонентам и изначально был введен термин «белковая корона». Корона модифицирует физико-химические свойства поверхности наноносителя, определяет его поведение в кровотоке и, в конечном счете, фармакокинетику и биораспределение инкапсулированного лекарства. После модификации поверхности в биологической среде комплекс, образованный наночастицей и более-менее прочно связанными с её поверхностью белками, становится новой единицей доставки.

Картина взаимодействия липосом различного состава с белками плазмы остается фрагментарной. В связи с этим специальное исследование поведения новых липосомальных препаратов в плазме крови является актуальным. Формирующаяся на поверхности липосом белковая корона, как правило, включает в себя белки-опсоны, а именно, компоненты системы комплемента (СК), что

способствует узнаванию липосом рецепторами иммунокомпетентных клеток и возможной потере стабильности. Поэтому потенциально все наноносители являются объектами действия врожденной иммунной системы, в первую очередь, системы комплемента. Реакции гиперчувствительности различной степени тяжести, вплоть до анафилактического шока, связанные с активацией СК, были отмечены у значительной части пациентов при внутривенном введении липосомальных препаратов Doxil[®], Ambisome[®], а также мицеллярного препарата Taxol и др. [12]. Одна из причин развития таких реакций – применение липосом, покрытых цепями полиэтиленгликоля (т.н. пегилирование за счет введения в мембрану конъюгата PEG с липидом, PEG-липидом) с целью предотвращения быстрого выведения из кровотока клетками ретикулоэндотелиальной системы. В связи с этим разрабатываются различные стратегии преодоления возможных острых инфузионных реакций, сопровождающих применение наномедицинских препаратов [13].

Липосомы, ранее разработанные в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, представляют собой 100-нм моноламеллярные везикулы, несущие в жидкофазном липидном бислое диолеилглицеридные сложноэфирные конъюгаты лекарств — липофильные пролекарства химиотерапевтических препаратов мелфалана и метотрексата; матрица липосом составлена из природных липидов – яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита из пекарских дрожжей или из соевых бобов [14], [15]. Такой способ включения лекарств в наноразмерные липосомы позволяет получить терапевтически значимую загрузку активного препарата. При инкапсулировании лекарства во внутренний водный объем нанолипосом, для достижения его эффективной концентрации необходимо использовать метод так называемой активной загрузки (remote loading), который применим лишь для ограниченного числа лекарств, в том числе слабых амфифильных кислот или оснований, например, антибиотиков антрациклинового ряда. Мелфалан и метотрексат не принадлежат к числу таких молекул. Дополнительное преимущество в случае пролекарства мелфалана заключается в том, что

гидролитически нестабильные 2-хлорэтильные группы оказываются в липидном окружении мембраны липосом. Это должно стабилизировать алкилирующие группы, как было показано для липосомальной формы липофильного пролекарства хлорамбуцила [16].

Терапевтическая эффективность липосомальных препаратов липофильных пролекарств мелфалана (или сарколизина, *D,L*-мелфалана) и метотрексата подтверждена в экспериментах *in vivo* на моделях опухолей мышей. Показано значительное усиление противоопухолевого эффекта по сравнению с исходными лекарствами на мышинных моделях опухолей: при лечении лейкоза Р-388 [17], аденокарциномы молочных желез [18], карциномы легких Льюис [19], острой Т-клеточной лимфомы [20]. В тестах *in vitro* показано, что данные липосомальные препараты не влияют на основные форменные элементы крови человека — эритроциты и тромбоциты. Однако в отличие от инертных препаратов с пролекарством мелфалана (M₁ph-липосомы), метотрексат-содержащие липосомы (МТХ-липосомы) вызывали умеренные нарушения в системе коагуляции крови и активировали систему комплемента [21]. Были получены первые данные о различиях в связывании ряда функционально важных белков плазмы крови, в том числе компонентов системы комплемента, с МТХ- и M₁ph-липосомами [22].

Состояние указанных липосомальных препаратов в плазме крови ранее не исследовалось. Кроме того, приведенные выше результаты получены только для липосом базового фосфолипидного состава, который не оптимизирован с точки зрения фармакологических свойств. Введение в мембрану липосом компонентов, экранирующих от взаимодействия с белками плазмы, может повысить стабильность липидного бислоя, а также уменьшить вероятность опсонизации и последующего поглощения фагоцитами крови. В связи с этим изучение влияния стабилизирующих молекул в бислое на взаимодействия липосом с белками плазмы является актуальным.

Цели и задачи

Целью настоящей работы явилось изучение влияния стабилизирующих молекул в бислое на взаимодействия наноразмерных липосом, несущих липофильные пролекарства метотрексата и мелфалана, с компонентами плазмы и крови.

Поскольку ранее были получены данные о связывании центрального компонента системы комплемента C3 и фактора H с МТХ-липосомами [21], первой задачей настоящей работы стало продолжение исследований этих взаимодействий с целью выяснения участия классического и альтернативного путей при активации СК.

Следующей задачей стало исследование взаимодействий МТХ-липосом с субпопуляциями лейкоцитов крови человека, так как опсонизация наноносителя белками СК способствует его распознаванию рецепторами иммунокомпетентных клеток. Планировалось выяснить, как влияют на взаимодействия с лейкоцитами защитные амфифильные молекулы, экранирующие мембрану липосом, но отличные от конъюгатов PEG: фосфатидилинозит, ганглиозид GM₁ и конъюгат N-карбоксиметилированного олигоглицина с фосфатидилэтаноламином (пептидолипид SMG-PE).

Для липосом с пролекарством мелфалана (которые не активируют СК, см. выше) была поставлена задача исследования стабильности в сыворотке крови человека и влияния на этот параметр защитных амфифильных молекул в бислое.

Заключительной задачей настоящей работы стало изучение взаимодействий M μ ph-липосом различного состава с сывороточным альбумином на субмолекулярном уровне.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе настоящей работы впервые установлено, что введение липофильного пролекарства метотрексата в мембрану липосом на основе яичного фосфатидилхолина стимулирует их захват моноцитами крови человека. В связи с этим липосомы с пролекарством метотрексата представляют интерес не только для терапии злокачественных заболеваний крови (как показано ранее на модели острой Т-клеточной лимфомы мышей [20]), но и для лечения целого ряда воспалительных заболеваний, в патобиологии которых моноциты играют важную роль, таких как артрит, воспалительные заболевания кишечника, хроническая обструктивная болезнь легких и различные формы гломерулонефрита [23]-[25]. В то же время, МТХ-липосомы способны активировать систему комплемента, поэтому необходимо учитывать возможность возникновения инфузионных реакций и предпринимать меры по их профилактике с учетом анамнеза пациента [13].

На примере липосом с пролекарством мелфалана впервые проведено сравнение способности фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁, пептидолипида SMG-PE и PEG-липида стабилизировать жидкофазную мембрану в сыворотке крови человека. Показано, что ганглиозид GM₁ и пептидолипид лучше, чем фосфатидилинозит защищают бислой на основе яичного фосфатидилхолина. Установлено, что PEG-липид разрушает мембрану мелфалановых липосом за счет диссоциации в водную фазу. Пегилирование стабилизировало липосомы на основе конденсированного липидного бислоя в жидкокристаллической упорядоченной (liquid ordered) фазе – из дистеароилфосфатидилхолина с достаточным количеством холестерина. Однако при получении таких липосом требуется повышенная температура (до 60°C), что вызывает преждевременный гидролиз активных хлорэтильных групп мелфаланового остатка.

Кроме того, у пациентов все чаще обнаруживаются антитела к PEG-цепям, что негативно сказывается на состоянии больного при введении препарата и

требует корректировки плана лечения. Необходим поиск альтернативных защитных молекул для создания липосом с достаточным временем циркуляции в кровотоке при минимальном риске непрогнозируемых реакций гиперчувствительности. В связи с этим, полученные нами результаты изучения стабильности липосом с пролекарством мелфалана в сыворотке крови человека имеют практическое значение. Препарат лиофилизированных Mph-липосом с фосфатидилинозитом уже показал значительное преимущество, по сравнению с Алкераном® (мелфаланом), в исследованиях острой токсичности и переносимости на крысах, а также противоопухолевой эффективности на модели рака молочных желез мышей (*Tretiakova et al. Curr. Drug. Deliv. 2020*). Можно ожидать, что замена фосфатидилинозита на ганглиозид GM1 или пептидолипид SMG-PE будет способствовать дальнейшему улучшению фармакологических свойств липосом.

Методология и методы исследования

Методологическая структура данного исследования включала этапы химического синтеза липофильного производного метотрексата, конструирования липосом различного состава, их характеристики и анализа взаимодействий с компонентами плазмы крови. Пролекарство метотрексата синтезировали в три стадии из фармакопейного препарата по разработанной ранее методике. Липосомы получали стандартным методом экструзии через фильтры с калиброванными наноразмерными порами. Размеры липосом определяли с помощью фотонной корреляционной спектроскопии (*sin* динамическое рассеяние света, DLS) или методом анализа траекторий движения наночастиц (NTA), ζ -потенциалы – с помощью DLS. Взаимодействия липосом с белками плазмы крови и стабильность исследовали с помощью биохимических и физико-химических методов анализа: гель-хроматографии, иммуноблоттинга, флуоресцентной и ИК-спектроскопии. Для МТХ-липосом оценивали поглощение лейкоцитами крови методом проточной цитометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

Новые данные о связывании белков плазмы липосомальными препаратами с пролекарством метотрексата позволили сделать вывод, что активация системы комплемента МТХ-липосомами осуществляется по механизмам как классического, так и альтернативного путей.

Установлено, что МТХ-липосомы вызывают фрагментацию центрального компонента системы комплемента белка С3 и образуют комплексы с продуктами расщепления его фрагмента С3b независимо от наличия в мембране экранирующих молекул, в том числе фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ и липидного конъюгата N-карбоксиметилированного олигоглицина SMG-PE. Показано, что пролекарство метотрексата в мембране липосом стимулирует их фагоцитоз моноцитами в крови человека независимо от наличия экранирующих молекул.

Установлено, что ганглиозид GM₁ и пептидолипид SMG-PE стабилизируют липосомы с пролекарством мелфалана в сыворотке крови человека не менее 24 ч, фосфатидилинозит – не менее 4 ч.

Показано, что связывание сывороточного альбумина на поверхности Mlp-липосом, содержащих фосфатидилинозит или ганглиозид GM₁, не влияет на структуру липидного бислоя. В отсутствие экранирующих молекул альбумин внедряется в гидрофобную часть липидного бислоя, что сопровождается конформационными изменениями и агрегацией белка.

Обнаружено на примере липосом с пролекарством мелфалана, что включение конъюгата полиэтиленгликоля с липидом в жидкофазную мембрану или в липидный бислой в гелевой фазе приводит к быстрому разрушению липосом в сыворотке. Достаточный уровень пегилирования (10 мол %) хорошо стабилизирует липидный бислой, содержащий *quantum satis* холестерина, то есть

находящийся в так называемой жидкокристаллической упорядоченной фазе (liquid ordered).

Апробация работы

Материалы работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на 13 конференциях и конгрессах: на XXVIII, XXIX, XXX и XXXII Зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2016, 2017, 2018 и 2020), на двух международных конференциях «Liposome Research Days» (Афины, Греция, 2017 и Саппоро, Япония, 2019), на двух конгрессах «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2017 и 2019), на 11-м европейском саммите «Clinical Nanomedicine, targeted delivery and precision medicine» — CLINAM (Базель, Швейцария, 2018), на конференции «Биомембраны» (Долгопрудный, Россия, 2018), на XIV и XV Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2017 и 2018), на V съезде биохимиков России (Дагомыс, Россия, 2016).

По материалам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах:

1. **Третьякова Д.С.**, Онищенко Н.Р., Вострова А.Г., Водовозова Е.Л. Взаимодействия противоопухолевых липосом, несущих липофильные пролекарства в бислое, с белками плазмы крови // Биоорг. Хим. **2017**. Т. 43. N. 6. С. 661-673. 10.7868/S0132342317060100
2. **Tretiakova D.**, Onishchenko N., Boldyrev I., Mikhalyov I., Tuzikov A., Bovin N., Evtushenko E., Vodovozova E. Influence of stabilizing components on the integrity of antitumor liposomes loaded with lipophilic prodrug in the bilayer // Colloids Surf. B. **2018**. V. 166. P. 45–53. 10.1016/j.colsurfb.2018.02.061

- 3.. *Tretiakova D.S* Alekseeva, A.S., Galimzyanov T.R., Boldyrev A.M., Chernyadyev A.Yu., Ermakov Yu.A., Batishchev O.V., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. Lateral stress profile and fluorescent lipid probes. FRET pair of probes that introduces minimal distortions into lipid packing // *BBA Biomembranes*. **2018**. V. 1860. P. 2337-2347. 10.1016/j.bbamem.2018.05.020
4. *Tretiakova D.*, Svirshchevskaya E., Onishchenko N., Alekseeva A., Boldyrev I., Kamyshinsky R., Natykan A., Lokhmotov A., Arantseva D., Shobolov D., Vodovozova E. Liposomal Formulation of a Melphalan Lipophilic Prodrug: Studies of Acute Toxicity, Tolerability, and Antitumor Efficacy // *Curr. Drug. Deliv.* **2020**. V. 17: 1. 10.2174/1567201817666200214105357
5. *Tretiakova D.S.*, Khaidukov S.V., Babayants A.A., Frolova I.S., Shcheglovitova O.N., Onishchenko N.R., Vodovozova E.L. Lipophilic prodrug of methotrexate in the membrane of liposomes promotes their uptake by human blood phagocytes // *Acta Naturae*. **2020**. V. 12. № 1 (44). P. 99-109. 10.32607/actanaturae.10946

2. Обзор литературы

В обзоре литературы рассматриваются основные двужущие силы сорбции белков на поверхности систем доставки лекарств различной природы при их введении в кровоток. Приводятся примеры основных белков корон, часть из которых мы детектировали в своих экспериментах на поверхности липосом, анализируются возможные последствия распознавания этих компонентов клетками крови. Отдельная глава посвящена критическому рассмотрению методов изучения белковых корон.

2.1. Влияние параметров наночастиц на взаимодействие с белками плазмы крови

При попадании в биологическую среду, в первую очередь мы рассматриваем кровь, любые наноразмерные системы доставки мгновенно связывают белки, которые образуют так называемую белковую корону. На взаимодействие оказывают влияние: время нахождения в среде, размер и форма частицы, её состав и заряд, а также химическая природа и свободная энергия поверхности [26]-[29]. После ассоциации с белками частица теряет свою «синтетическую уникальность» и приобретает новые свойства, обусловленные воздействием среды.

Наночастица (НЧ) с белковой короной имеет отличный от исходного ζ -потенциал и гидродинамический радиус. Модуль значения ζ -потенциала снижается после образования короны как для отрицательно заряженных [30] так и для положительно заряженных [31] НЧ. Для положительно заряженных частиц наблюдают активную сорбцию белков и смену знака ζ -потенциала, что объясняется распространённостью белков с отрицательным зарядом [32]. Для исходно отрицательно заряженных наночастиц небольшая компенсация заряда возможна благодаря присутствию в физиологических условиях белков с ζ -потенциалом достигающим +10 mV [30], как, например, фибриноген с $pI = 5.8$ [33]. Даже инкубация НЧ с противоположными значениями ζ -потенциала (+40 мВ

и -39 мВ) только с сывороточным альбумином приводит к образованию комплексов с унифицированным ζ -потенциалом (-19 мВ) [34]. Сообщается, что белки с изоэлектрической точкой <5.5 с большей вероятностью связываются с положительно заряженными поверхностями, а белки с $pI > 5.5$ скорее обнаруживаются в белковых коронах отрицательно заряженных наночастиц [35].

Увеличение гидродинамического радиуса при формировании белковой короны происходит для несжимаемых наночастиц [30] и при взаимодействии корон соседних НЧ с образованием кластеров из нескольких комплексов [36]. Уменьшение гидродинамического радиуса является последствием сжатия наночастицы из-за осмотического давления на ее поверхности при адсорбции белков: некоторые липосомы высвобождают воду из внутреннего объема для компенсации большей осмолярности с внешней стороны бислоя [37], [38].

Белковая корона наночастиц формируется благодаря высокому значению свободной энергии поверхности, которое обуславливает адсорбцию различных биомолекул, в первую очередь, белков. К силам, порождающим ассоциацию с поверхностью, относятся Ван-дер-Ваальсовы, гидрофобные, электростатические взаимодействия, водородные связи, а также π - π сопряжение [37]. На величину поверхностной энергии влияют гетерогенность химической природы поверхности и ее кривизна. Физика и химия поверхности исключительно сложны. Недаром еще в 1920 г. физик Вольфганг Паули сказал: «God made the bulk; the surface was invented by the devil» («Бог создал объем; поверхность придумал дьявол») (см. например, [39]). Значимый вклад в значение поверхностной энергии наночастицы вносит кривизна её поверхности [40].

При образовании короны постоянно изменяются физико-химические параметры поверхности. В процессе сорбции-десорбции белки взаимодействуют не только с наночастицей, но и с другими компонентами короны. В результате суммарного вклада различных взаимодействий формируются так называемые жесткая и мягкая короны [41], [42]. К жесткой короне относят белки, практически

необратимо связывающиеся с поверхностью НЧ, для которых константа скорости ассоциации значительно превосходит константу скорости диссоциации (**Рисунок 1**). В процессе формирования жесткой короны возможно сильное изменение конформации белка при связывании с поверхностью [42]. В жесткой короне кооперативные эффекты между связанными с поверхностью белками поддерживают стабильность всего комплекса. Внедрение новых компонентов в слой невыгодно из-за необходимости разрыва установленных связей и реорганизации множества взаимодействий [43], [44]. «Мягкая» корона характеризуется высокими скоростями обмена белками со средой, причем одновременно протекают сразу несколько процессов обмена. Данную часть короны составляют наименее прочно связанные белки [45], [46].

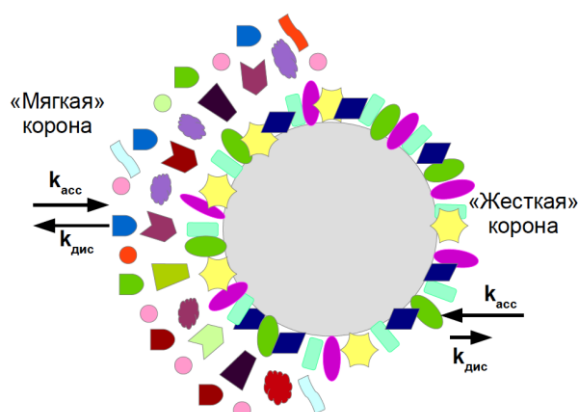


Рисунок 1. Схематическое изображение белковой короны, образующейся на поверхности наночастиц при контакте с плазмой [46].

Для формирования первичной короны достаточно 30 с [47]. За это время с поверхностью ассоциирует более 100 различных белков [48]. Для неорганических и полимерных частиц качественный состав короны, сформированной за 30 с, больше не изменяется. При длительных временах воздействия биологической среды увеличивается количество ранее сорбированных белков [42], [47]. Для липосом при продолжительном контакте с плазмой крови человека наблюдаются акты сорбции–десорбции, ведущие к изменениям в составе короны [49]. Эти изменения описывают теорией, известной как «эффект Вромана». В своих экспериментах Лео Вроман наблюдал временные различия в сорбции альбумина, фибриногена и кининогена сначала на стекле, а затем и на других поверхностях.

Несмотря на меньшее сродство к поверхности, более распространенные белки меньшего размера быстрее диффундировали к ней, чем обладающие большим сродством, размером и меньшей концентрацией в крови. С течением времени «медленные» белки, взаимодействующие с большей аффинностью, вытесняли менее удерживаемые [50], [51]. То есть альбумин, а затем и фибриноген первыми связываются с любой поверхностью не только за счет скоростей диффузии, но и из-за своей распространенности в среде [52]-[54]. Белки, для которых характерна меньшая концентрация в среде подходят к поверхности наночастицы позже [52]. Эффект Вромана активно обсуждается в литературе и переосмысливается [42], [55], [56]. Авторы [57] считают, что критика модели вызвана её серьезным упрощением: диффундирующие к поверхности белки рассматриваются как идеальные, не взаимодействующие друг с другом частицы, находящиеся в состоянии Броуновского движения. В реальных экспериментах белки взаимодействуют между собой, и в процессе формирования короны есть вероятность проявления кооперативных эффектов. Один из классов белков крови при взаимодействии с НЧ может снижать локальный электростатический потенциал и облегчать взаимодействие для белков другого класса. Другой случай кооперативности, когда белки двух различных классов не конкурируют между собой (назовем их «дружественными»), но конкурируют с третьим классом за свободный объем в короне. Тогда замена третьего (общего конкурента) на один из «дружественных» белков облегчает взаимодействие с поверхностью НЧ для второго [58].

По данным авторов [48], из 160 белков, первоначально образовавших комплекс с катионными липосомами состава DC-Chol-DOPE (3β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)карбамоил]холестерин и диолеоилфосфатидилэтанолламин), 127 оставались ассоциированными с поверхностью более 1 ч, еще для ~ 50 наблюдалось взаимодействие с поверхностью и ранее ассоциированными белками в разные моменты времени существования белковой короны на везикуле. **(Рисунок 2)**. К первоначально взаимодействующим белкам относят альбумин,

фибриноген, иммуноглобулины класса G и аполипопротеины. В ходе последующей медленной фазы образования короны с поверхностью наночастиц ассоциируют факторы коагуляции [27, с. 8]

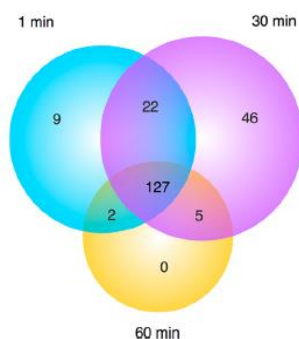


Рисунок 2. Диаграмма Эйлера-Венна, отражающая изменения количественного состава белковой короны липосом DC-Chol-DOPE с течением времени (из работы [48]).

Считается, что наиболее значимые изменения в белковой короне происходят на ранних стадиях инкубации в плазме крови вне зависимости от других характеристик липосом [47].

На количество связываемых белков влияет заряд поверхности [32]. Сообщается, что незаряженные поверхности связывают меньшее количество белка и отличаются более низкими скоростями опсонизации — связывания с иммуноглобулинами класса G, белком системы комплемента C3b и фибронектином, в сравнении с заряженными аналогами [59]. Возможно, меньшая скорость опсонизации и приводит к уменьшению общего количества белка на поверхности. Наряду с зарядом рассматривают также гидрофобность поверхности. Хотя оба параметра изменяют количественный состав короны, они не вносят значительного вклада в её качественный состав [59].

Другой варьируемый параметр при изучении формирования короны на поверхности наночастиц — их размер. Для НЧ, сравнимых с размером самих белков — до 10 нм, установили, что жесткая корона формируется одним прерывистым слоем белков и за меньший промежуток времени. Когда размер наночастицы значительно превышает размеры белка, её поверхность

воспринимается практически плоской и может удержать более плотную жесткую корону [43]. Такой эффект связан с кривизной поверхности НЧ. Кривизна также влияет на конформацию сорбируемого белка [53]. При высокой кривизне поверхности менее выгодны вторичные взаимодействия белок–белок [27, с. 8], что отражается на толщине короны и ее составе. Для мелких НЧ наблюдают большее разнообразие белков в их коронах [27, с. 8]. С размером наночастицы связан ещё один параметр, важный для образования белковой короны — площадь поверхности частицы. При уменьшении размера площадь поверхности наночастицы уменьшается в значительно меньшей степени, чем её объем, увеличивая соотношение поверхность/объем. Поэтому при расчете количества связанного белка на единицу массы частицы, получается большее значение для меньшей по размеру наночастицы [59]. При инкубации с плазмой крови золотых НЧ размером 30 и 50 нм, авторы [30] наблюдали большее количество связанного белка на меньших частицах. Размер носителя влияет на биораспределение [60], [61] и не может рассматриваться только с позиции количества связываемого белка. Для липосом, как и для других наноносителей, найдены некоторые закономерности их поведения *in vivo* в зависимости от размера при сходном составе [26]. Везикулы диаметром 100–150 нм накапливаются в опухоли по причине их пассивного транспорта в опухолевую ткань. Это явление описано [4], [62] как EPR (enhanced permeability and retention), то есть эффект избирательного облегченного проникновения макромолекулярных соединений через стенки сосудов опухоли и удерживания в ней. Эффект EPR обусловлен свойствами солидных опухолей, такими как активный ангиогенез и повышенная васкуляризация, увеличение продукции сосудистых медиаторов, дефектная архитектура, то есть хаотичность сосудов и наличие крупных пор в сосудистом эндотелии, ухудшенный лимфатический клиренс (дренаж) макромолекул и липидов из интерстициального пространства ткани.

На состав белковой короны влияют и независимые от характеристик наночастиц факторы. На поверхности носителя могут концентрироваться белки,

содержание которых в кровотоке зависит от имеющейся у пациента патологии [63]. Авторы [64] сравнивали белковые короны липосом, инкубированных с плазмой здоровых доноров и пациентов с аденокарциномой печени, раком желудка или раком груди. В ходе исследования обнаружили, что при аденокарциноме печени, в сравнении с другими образцами крови, на поверхности липосом концентрируются в основном иммуноглобулины классов А и G, специфические к антигенам данной опухоли.

Белки, связанные с поверхностью НЧ, влияют на эффективность доставки лекарственного препарата изменяя захват наночастиц целевыми клетками [61], [63], [65]-[67] и, зачастую, вызывая активацию механизмов выведения чужеродных объектов из организма [68], [69]. Белковая корона изменяет, но не унифицирует механизм поглощения наночастиц клетками. После образования короны в разных экспериментах наблюдали переход от макропиноцитоза к клатрин-опосредованному эндоцитозу или от эндоцитоза с участием клатрина к кавеолин-опосредованному эндоцитозу [63].

Для повышения эффективности захвата систем доставки лекарств клетками-мишенями разрабатываются различные методы нацеливания с использованием лиганд-рецепторных взаимодействий: пресорбция или конъюгация с белком плазмы, который уменьшит неспецифическую сорбцию в кровотоке и будет распознаваться нужными клетками; прививка к поверхности носителя олигонуклеотидных аптамеров или низкомолекулярных лигандов [55]. В первой концепции может использоваться белок-переносчик железа в крови — трансферрин [70], а в качестве низкомолекулярных лигандов популярностью пользуется фолиевая кислота [71], [72].

Наиболее распространенным приемом для уменьшения количества сорбированного белка является покрытие поверхности НЧ полиэтиленгликольными цепями [42], [55], [73], [74]. PEG используется как для неорганических наночастиц, так и для липосом. Для последних в бислой

встраивают конъюгаты липидов с молекулами PEG различной длины. Несмотря на улучшение характеристик наноносителя после покрытия поверхности полиэтиленгликольными цепями, не удается полностью избежать адсорбции белков и узнавания клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) даже при высокой плотности покрытия наночастицы молекулами PEG. Авторы [75] наблюдали частичное снижение уровня поглощения макрофагами полимерных наночастиц размером 100 и 30 нм, покрытых молекулами PEG. В другом исследовании [68] увеличение плотности покрытия поверхности золотых НЧ молекулами PEG уменьшало общее количество белков, связавшихся с частицей, но не изменяло состав короны. Предполагается, что на поверхности наночастиц возможно формирование богатых и обедненных PEG участков, образование которых обусловлено взаимодействием молекул полимера между собой [76].

Эффективность защиты поверхности липосом с помощью PEG зависит от плотности покрытия, а также от длины молекул полимера [76], [77]. Уменьшение размера НЧ при сохранении плотности покрытия молекулами PEG увеличивает количество белков, связываемых поверхностью наночастицы, так как при увеличении кривизны поверхности соседние молекулы PEG стерически взаимодействуют меньше. Это приводит к уменьшению термодинамического барьера для адсорбции белков плазмы. При варьировании длины молекул PEG модификация поверхности липидных наночастиц короткоцепными PEG (молекулярная масса ~1000) приводила к большей адсорбции белков, чем при пегилировании крупными полимерными остатками (2000 и 5000 Да). При значительном увеличении длины цепи полимера уменьшается захват модифицированной частицы не только клетками РЭС, но и целевыми опухолевыми клетками [76]. То есть эффективность поглощения макрофагами за счет доступности для них опсопинов определяется плотностью покрытия наночастицы и ее размерами. Предполагается, что стерические препятствия для поглощения клетками, которые создает PEG на поверхности липосом, позволяют увеличить время нахождения липосом в кровотоке даже при связывании ими

некоторого количества белков СК [78]. В исследованиях последних 5 лет обнаружили, что с пегилированными системами доставки больше связывается кластерин (Аро J) [79], и что в белковой короне таких липосом присутствует АроЕ. Оба этих белка уменьшают захват клетками РЭС [74].

С конца 20-го века полиэтиленгликоль считался неиммуногенной добавкой, применяемой в фармацевтической и косметической промышленности [80]. В 2007 году сообщалось, что антитела к молекулам PEG присутствуют в крови 25% здоровых доноров при размере выборки 350 человек. У разных доноров наблюдались анти-PEG IgG, IgM или оба класса антител вместе, хотя до анализа никто не получал PEG-содержащих препаратов для внутривенного введения [81]. В работе 2015 года [82] при меньшей выборке из 31 донора, сообщалось, что различные комбинации антител к PEG обнаружены у 42% обследованных, а также приводились данные других исследований с подобными значениями (38–44% для небольших выборок пациентов до 70 человек с лейкемией или гепатитом С [81], [83]). Механизм образования таких антител не установлен. Предполагают, что молекулы полиэтиленгликоля могут проникать в место воспаления, например, из косметических средств или продуктов бытовой химии при нарушении кожных покровов и вызывать иммунизацию [80], [82]. В качестве аналогов PEG для снижения опсонизации наночастиц исследуют действие декстранов, плуроников, полксаминов, силиконов, полисорбатов, [27], поливинилпирролидона, полиглицерина, поливинилового спирта и ганглиозидов [80], [84]. Известно, что наблюдается снижение общего количества адсорбированного белка плазмы при включении в липидный бислой липосом холестерина [85].

Достигнуть меньшего связывания белков плазмы с поверхностью систем доставки удастся при покрытии их мембранными белками клеток крови — эритроцитов, моноцитов, тромбоцитов [74]. Данный подход успешно использовали и для липосом, создав биомиметики лейкоцитов — лейкосомы, которые связывали меньше различных классов белков [49]. Однако такие миметики хуже адгезировали на клеточную мембрану [74].

Разрабатываются способы «привлечения» альбумина в качестве единственного компонента белковой короны из-за низкой иммуногенности и увеличения времени циркуляции в кровотоке таких комплексов [74]. Авторы [85] создали наногели с полостями, соответствующими геометрии альбумина, для его сорбции и удерживания на поверхности после введения наногелей в кровоток. Другой способ базируется на наличии у альбумина 7 сайтов связывания жирных кислот. Для образования ассоциатов с альбумином *in situ* создаются конъюгаты нуклеиновых кислот с диглицеридами или высшими спиртами [74], [86].

2.2. Основные компоненты белковой короны липосом и последствия их сорбции

Основной движущей силой сорбции белков на поверхности липосом считаются электростатические и гидрофобные взаимодействия [87]. Для формирования белковой короны важны все компоненты мембраны. На аффинность связывания отдельного белка плазмы влияет совместное присутствие в бислое липидов различных классов [88]. Многокомпонентность и различия составов бислоев исследуемых липосом обусловлены целью их применения: для генной терапии и доставки отрицательно заряженных нуклеиновых кислот используют липосомы, содержащие катионные или так называемые ионизируемые липиды, для доставки низкомолекулярных лекарств используют формуляции из цвитерионных липидов или их комбинации с отрицательно заряженными липидами [9], [89], [90]. Однако результирующая белковая корона компенсирует заряд липосом, и значение дзета-потенциала липосом с короной приближается к -20 мВ [91], [92]. Основная фракция короны липосом — белки с массой 30–100 кДа и изоэлектрической точкой (pI) <7 при физиологическом значении pH [91].

Среди всех компонентов белковой короны особое внимание уделяют компонентам системы комплемента (СК), иммуноглобулинам, фибронектину, которые относятся к опсонинам, а также альбумину, фибриногену, витронектину и

аполипопротеинам (дезопсониам) [93]. Связывание иммуноглобулинов, аполипопротеинов и компонентов системы свертывания крови происходит на поверхности липосом аналогично связыванию с другими наночастицами [59], [94].

Иммуноглобулины – группа гликопротеинов, содержащихся в плазме крови всех млекопитающих. Все пять классов представляют собой бифункциональные агенты, связывающие антиген и осуществляющие эффекторные функции. Каждый класс обладает своим набором функций. К ним относятся: тканеспецифичное связывание, связывание с клетками иммунной системы, а также с первым компонентом СК при активации её классического пути — C1q. При исследовании связывания иммуноглобулинов классов G, M и A с однокомпонентными липидными слоями из фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидилхолина или фосфатидилэтаноламина наблюдали вариации в количестве адсорбированных антител. Так IgG в значительной степени ассоциирует только с фосфатидилхолином [95]. Другие липидные поверхности не показали существенного связывания трех названных классов антител [95], хотя есть данные об увеличении количества связываемых иммуноглобулинов при увеличении времени инкубации [93].

Наличие IgG на поверхности наночастиц усиливает их фагоцитоз лейкоцитами, если консервативный домен Fc доступен для связывания рецептором фагоцита [91], [96]. При той же ориентации на поверхности, когда Fv области связаны, а Fc домен доступен для распознавания, иммуноглобулины класса G способны «сенсibiliзировать поверхность», облегчая связывание компонента системы комплемента C3 с системой доставки. Они увеличивают эффективность связывания метастабильного C3b с поверхностью, при этом уменьшая взаимодействие C3b с ингибирующим его фактором H. Образование иммунных комплексов с C3 усиливает активацию СК [97], [98]. В экспериментах с плазмой, обедненной IgG, снижалась опсонизация поверхности белками C3 и C1q. Добавление человеческих поликлональных IgG увеличивало сорбцию

компонентов СК [99]. Если же в ходе образования белковой короны IgG связывается с поверхностью системы доставки через Fc домен, то возможно подавление активации СК [100]. Авторы [101] заметили, что распознавание участка тяжелой цепи иммуноглобулинов влияет на взаимодействие с клетками линии HeLa.

Взаимодействие иммуноглобулинов класса M с системами доставки также приводит к активации СК по классическому пути из-за узнавания и высокоаффинного связывания константной области IgM с белком C1q [102]. Для пегилированных липосом ассоциация с IgM, по данным [103], способствует ускоренному выведению НЧ из кровотока. Данный феномен, известный в литературе как accelerated blood clearance (ABC), заключается в изменении фармакокинетики второй дозы пегилированных наноносителей [104]. После первой инъекции провоцируется секреция IgM селезенкой, которые затем, селективно связываясь с PEG, способствуют активации СК и выводу наночастиц из кровотока макрофагами печени. Интенсивность выведения второй дозы снижается спустя 14 дней после первого применения, однако не возвращается к первоначальному уровню. Выраженность данного явления будет зависеть от дозы препарата и свойств наноносителя, таких как размер и заряд поверхности, плотность и размер цепей PEG.

Имуноглобулины класса A, в свою очередь, могут усиливать поглощение наночастиц гепатоцитами и способствовать активации системы комплемента по альтернативному пути [93], [105].

Также известны природные антитела, специфичные к фосфолипидам и их комплексам с сывороточными фосфолипид-связывающими белками, такими как β 2-гликопротеин I или протромбин. Зачастую секреция данных антител в организме связана с течением определенного аутоиммунного заболевания [106].

Белки системы комплемента (СК) относятся к факторам врожденного иммунитета и могут способствовать выведению НЧ из кровотока. После

активации СК белки действуют последовательно, образуя каскад. Выделяют три основных пути активации системы комплемента: классический, когда каскад реакций вызывается образованием иммунного комплекса; лектиновый, реализуемый в присутствии бактерий и опосредованный манноза-связывающим белком; и альтернативный, основанный на иммуно-неспецифическом связывании компонента системы комплемента C3b [107] (механизм активации СК описан в Приложении 1). Лектиновый путь наименее характерен для наночастиц, однако он может реализовываться, если поверхность системы доставки защищена полисахаридами, плурониками или поллоксаминами в развернутой «щеточной» конформации [100].

Активация по классическому пути происходит при связывании первого белка каскада СК – C1 – посредством электростатических взаимодействий с иммунными комплексами или же напрямую с целевой поверхностью без их участия. Белок C1 чувствителен к ионной силе и присутствию ионов Ca^{2+} , необходимых для связывания [108]. Связывание белка наблюдается для широкого круга различных макромолекул. В результате запуска каскада реакций образуются C3-конвертазы, характерные для различных путей активации СК. При расщеплении белка C3 конвертазами образуются фрагменты C3a и C3b, первый из которых является анафилатоксином, вызывающим высвобождение гистамина из тучных клеток и развитие воспаления, а другой способен связываться с различными поверхностями, приводя к дальнейшему развитию каскада СК и опсонизации (схема полного расщепления компонента C3 приведена в *Приложении 2*). Внутримолекулярная тиоэфирная связь в нативном белке C3 спрятана в гидрофобный карман той части белка, которая после расщепления становится C3b. При связывании с поверхностью происходит изменение конформации C3, что делает эту связь более доступной [109]. Оказываясь незащищенной, она быстро подвергается гидролизу. Высокореакционноспособная тиоэфирная группа тем не менее обладает определенной специфичностью к наиболее доступным стерически гидроксигруппам. Основными соединениями, вступающими в реакцию, являются

углеводы и иммуноглобулины класса G [110], также сообщается, что при изменении конформации белков в ходе образования короны спонтанным образом могут становиться доступными функциональные группы, подвергающиеся атаке C3b [111]. Если C3b взаимодействует с компонентом мягкой короны и такой комплекс может отделиться от системы доставки, её опсонизации не происходит, но атака C3b будет повторяться на следующие молекулы короны с доступными функциональными группами [112]. Ковалентно связанный с поверхностью в результате транс-ацилирования белок C3b может способствовать дальнейшей активации СК, что в конечном итоге приводит к образованию лизирующей мембрану комплекса C5b-9. Отмечается, что расщепление белков C3 и C5 и усиление каскада СК может происходить под действием плазмина и факторов коагуляции X и XIa [113], которые детектируются в белковых коронах [114].

Высвобождение анафилатоксинов C3a и C5a при активации СК может вызвать развитие псевдоаллергических реакций гиперчувствительности к препарату (CARPA – Complement Activation-Related Pseudo-Allergy), которые проявляются через лихорадку, астму и даже анафилактический шок. Эти же симптомы характерны для реакций гиперчувствительности I типа, вызываемых наличием антител IgE к одному из компонентов лекарства [13]. Реакции CARPA, связанные с активацией системы комплемента, протекают и в отсутствие IgE к компонентам лекарства и поэтому не могут быть предсказаны с помощью существующих токсикологических и аллергологических тестов [12]. Для известного препарата Doxil[®], применяемого для лечения множественной миеломы, рака груди, рака яичников и саркомы Капоши, реакции CARPA при первом введении препарата встречаются у 25–45% пациентов [80]. Для преодоления этого побочного эффекта разработана специальная методика введения препарата и премедикации [115]. При рассмотрении механизма развития острых инфузионных реакций выделяют несколько стадий, способных ограничивать “CARPA-каскад”: активацию системы комплемента; воздействие анафилатоксинов на форменные элементы крови и клетки, секретируемые для

регуляции аллергической реакции; ответ эффекторных клеток (тромбоцитов, эндотелиальных клеток). При развитии псевдоаллергических реакций, вызванных активацией СК, воздействие на базофилы и макрофаги осуществляется как посредством узнавания сигнала от анафилатоксинов определенными рецепторами, так и путем связывания частицы, вызывающей данную реакцию, с рецепторами поверхности клеток. Взаимодействия с клетками приводят к дегрануляции, высвобождению гистамина и других маркеров для привлечения большего количества иммунокомпетентных клеток к месту воспаления, что сказывается на степени остроты инфузионной реакции [116], [117].

Одним из регуляторных белков СК служит фактор Н — гликопротеин, крови, постоянно секретируемый печенью, а также вырабатываемый различными эпителиальными, эндотелиальными клетками и тромбоцитами. Концентрация его варьирует от 100 до 500 мкг/мл. Фактор Н может подавлять связывание с поверхностью НЧ белка С1 и таким образом осуществлять регуляцию классического пути СК. При развитии альтернативного пути активность фактора Н заключается в расщеплении конвертазы этого пути. Также данный белок может выступать в качестве кофактора другого регуляторного белка — фактора I. Действие двух факторов приводит к расщеплению и инактивации фрагмента С3b, важного для развития каскада реакций СК. Постоянное поддержание секреции фактора Н необходимо для подавления опсонизации собственных клеток организма, которой способствует наличие некоторого постоянного уровня С3b в крови [95], [110], [118].

Основным ингибитором классического и лектинового путей является С4b-связывающий белок (С4ВР). Он представляет собой крупный гликопротеин, существующий в нескольких изоформах, для которых варьируется соотношение α - и β -цепей. Около 80% белка в плазме представлено изоформой с 7 α - и одной β -цепью. Данный гликопротеин контролирует развитие каскада СК посредством нескольких механизмов: протеолитической инактивации фрагмента С4b (совместно с фактором I), что приводит к невозможности образования С3-

конвертазы; блокирования образования С3-конвертазы путем связывания С4b; а также ускорения диссоциации комплекса, образующего конвертазы классического и лектинового путей.

Взаимодействие С4ВР с отрицательно заряженными фосфолипидами обусловлено формированием комплекса с протеином S (фактором протромбинового комплекса), зависимым от витамина К, который связывается с β -цепью и помогает локализовать комплекс на поверхности липидного бислоя [119]. Белки системы коагуляции и витамин К тоже определяются в короне [42], [64].

Другой белок, привлекающий фагоциты, — **фибронектин**. Растворимая форма белка, циркулирующая в крови, составляет один из основных компонентов плазмы (300 мкг/мл). Фибронектин плазмы синтезируется гепатоцитами печени и вовлечен в разнообразные процессы, включая воспалительные и репаративные, совместно с белками системы коагуляции [120]. При повреждении сосудов вместе с фибрином он формирует сгусток, который в ходе заживления раны расщепляется макрофагами [121]. Аналогично, фибронектин привлекает макрофаги при связывании с мембраной, что усиливает их фагоцитоз. Этот эффект наиболее ярко выражен для положительно заряженных липосом [122], [123].

Следующий распространенный компонент белковой короны — **альбумин**. Он составляет до 60% среди всех белков плазмы и его средняя концентрация в крови 40 мг/мл. Альбумин синтезируется и затем секретируется в кровотоки гепатоцитами печени. Основная функция этого белка — перенос нерастворимых и гидрофобных молекул: жирных кислот, гормонов и других метаболитов крови [124]. В литературе в отношении этого белка можно встретить термин «анти- или дезопсонин». Сорбция альбумина на поверхности систем доставки снижает опсонизацию НЧ и захват моноцитами, что положительно сказывается на продолжительности циркуляции НЧ в кровотоке [125], [126], [127]. Значительные количества альбумина детектируются на первых минутах взаимодействия липосом с плазмой крови [128]. При взаимодействии он способен проникать в

липидный бислой, претерпевая конформационные изменения [129] и как белок-переносчик способен связывать липофильные соединения [130]. Повышенная проницаемость мембраны для альбумина может иметь негативные последствия, такие как преждевременное высвобождение лекарства, но это отчасти компенсируется низкой аффинностью белка к бислою и его диссоциацией с мембраны [131]. На гидрофобных поверхностях альбумин обычно со временем заменяется на аполипопротеины различных классов [132], [133].

Фибриноген — гликопротеин, синтезируемый гепатоцитами печени. Он представляет собой комплекс из двух тримеров, каждый из которых состоит из цепей α , β и γ . Занимает второе место после альбумина по представленности в плазме. В ходе превращений белков системы коагуляции расщепляется до фибрина [134], поэтому отсутствует в сыворотке. В белковых коронах липосом этот белок идентифицируется отдельными цепями, масса каждой около 50 кДа [91]. Фибриноген быстро и количественно адсорбируется на различных поверхностях, вне зависимости от пегилирования [133]. Из-за низкого сродства к поверхности нейтральных и отрицательно заряженных липосом с течением времени фибриноген замещается на другие белки с большим сродством [122].

Витронектин — гликопротеин, синтезируемый в основном клетками печени, который участвует в агрегации тромбоцитов и адгезии макрофагов [135]. Взаимодействуя с комплексом C5b-9 витронектин, предотвращает лизис мембраны в ходе развития СК [136 с. 351-360]. Этим белком обогащена корона положительно заряженных липосом [137]. Один из доменов витронектина распознается $\alpha_v\beta_3$ интегринами [138]. Экспрессия этих рецепторов повышена в солидных опухолях и опухолевой сосудистой системе [139], что позволило отнести витронектин к «белковым отпечаткам» короны, улучшающим нацеливание системы доставки [92].

Аполипопротеины — белковые компоненты липопротеинов, вовлеченные в транспорт липидов в кровотоке и перенос их в клетки [140]. Они участвуют в

метаболизме холестерина и регуляции взаимодействий ферментов с липидами. Благодаря гибкой структуре, обусловленной наличием фрагментов α -спирали, данные белки могут взаимодействовать с различными молекулами, и поверхностями, изменяя свою конформацию. Авторы [92] относят аполипопротеины к «белковым отпечаткам» короны, улучшающим нацеливание системы доставки, вместе с витронектином. В коронах липосом аполипопротеины распространены вне зависимости от заряда и наличия PEG [76], [91], [133].

Аполипопротеин A-I (ApoAI) — основной компонент липопротеинов высокой плотности в плазме. Его присутствие в короне может иметь различные последствия. В ранних работах сообщается, что он может вызывать рецепторно-опосредованный эндоцитоз липосом гепатоцитами [141], [142], а также фагоцитоз макрофагами [143]. При некоторых патологиях в опухолевых тканях усиливается экспрессия рецепторов липопротеинов высокой плотности, или иначе Scavenger-рецепторов SR-B1, обычно участвующих в захвате макрофагами, и рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDLr) [92], [144]. В связи с этим в литературе последних 5 лет рассматривают возможность облегчения доставки в опухолевые ткани липосом с ApoAI, а также ApoAIV и ApoAII в короне из-за их специфического связывания с указанными рецепторами [88]. В работе [145] на примере клеточной линии PC3 карциномы простаты наблюдали рецепторно-опосредованный эндоцитоз липосом с аполипопротеинами в белковой короне. Помимо нацеливания ApoAI в короне липосом снижает опсонизацию их поверхности, во-первых, физически — занимая место в короне с константой связывания, превосходящей k_{acc} для альбумина и фибриногена [131], и во-вторых, как и ApoAII он мешает образованию лизирующей мембрану комплекса СК C5b-9 [100].

Аполипопротеин E (ApoE) — белок, входящий в состав хиломикронов и липопротеинов промежуточной плотности плазмы крови [146]. Аналогично аполипопротеинам класса A, он может взаимодействовать с липидным бислоем, преимущественно обеспечивая взаимодействие с отрицательно заряженными

липосомами и, в меньшей степени, с нейтральными. Именно ApoE служит основным регулятором эндоцитоза нейтральных липосом гепатоцитами [147]. Кроме того, ApoE помогает обеспечивать транспорт липопротеинов низкой плотности через гематоэнцефалический барьер, взаимодействуя с их рецептором LDLr [148]. Этот рецептор активно экспрессируется также опухолевыми клетками [88], [149], что, как предполагают, можно использовать для доставки препаратов в ткани мозга [148] и опухоли в целом [150]. Для повышения эффективности сорбции ApoE на липосомы предлагается модифицировать их поверхность специальным производным β -амилоида [151].

Кластерин, или ApoJ, представляет собой гетеродимерный гликопротеин, защищающий клетки от преждевременного апоптоза. Его биосинтез увеличивается при возникновении стресса для клеток [152]. Из-за способности Apo J связывать неправильно свернутые белки предполагают, что он может быть белком-шапероном [153]. К защите от стресса относят также связывание ApoJ с лизирующим мембрану комплексом СК C5b-9 в присутствии витронектина, которое инактивирует последнюю стадию развития СК [136 с. 341-349], [154]. Кластерин детектировали как в мягкой, так и в жесткой коронах липосом независимо от их заряда [91], [133] Взаимодействуя с различными НЧ, особенно в присутствии PEG-цепей, кластерин препятствует опсонизации наноносителя и сорбции IgG, концентрация которого в крови на 2 порядка выше [155]. Это, в свою очередь, снижает фагоцитоз НЧ [156].

Среди наиболее часто определяемых белков короны присутствует также ApoH или β 2-гликопротеин I. Этот белок плазмы крови связывает отрицательно заряженные фосфолипиды, например, кардиолипин, на поверхности окисленных липопротеинов низкой плотности, а также участвует в регуляции внутреннего пути коагуляции [106]. ApoH выступает в качестве кофактора при связывании антител, специфичных к липидам [157]. Его считают неспецифическим опсоном, который взаимодействует с отрицательно заряженными поверхностями, привлекая макрофаги [158]. В то же время, в недавних

исследованиях установлено, что ApoH в составе короны может усилить поглощение наноносителя не фагоцитирующими клетками [159].

2.3. Взаимодействия липосом и компонентов белковой короны с клетками крови

Белковая корона наночастиц не остается незамеченной клетками крови, в особенности, лейкоцитами. Взаимодействия с форменными элементами крови – эритроцитами, тромбоцитами и лейкоцитами – как правило, нежелательны и чреваты побочными эффектами, если только данные клетки не являются целевыми.

Как уже было упомянуто, одно из наиболее важных последствий опсонизации поверхности липосом — узнавание белков рецепторами фагоцитирующих клеток. Это, в свою очередь, будет влиять на скорость выведения из кровотока, причем процесс может значительно усиливаться, когда поверхность липосом несет лиганды для распознавания различными рецепторами. Показано, что основное количество липосом в кровотоке фагоцитируется лейкоцитами, а именно, моноцитами и нейтрофилами [160]. Первые составляют примерно 10-20% мононуклеарных клеток крови, которые можно разделить на 3 популяции: классические CD14+, неклассические CD16+ и промежуточные CD14+CD16+ моноциты. Со временем моноциты покидают кровоток и додифференцируются в различные популяции тканевых макрофагов [161]. Нейтрофилы представляют основную субпопуляцию полиморфноядерных гранулоцитов (PMN), около 95%, тогда как численность самих PMN — около 60-70% от общего числа лейкоцитов крови [162].

Классическими примерами белков, привлекающих лейкоциты, являются иммуноглобулины IgG1 и IgG3, компоненты системы комплемента C3b, iC3b и C1q, фибронектин, LPS-связывающий белок. Взаимодействие с лейкоцитами обнаружено также для тромбоспондина и фактора фон Виллебранда [163].

Иммуноглобулины обуславливают поглощение липосом через Fc- рецепторы, а именно через Fc γ -рецепторы (Fc γ R). Данный изотип рецепторов связывается с константным фрагментом иммуноглобулинов и имеет специфичность к IgG [164]. Активация СК по классическому пути с участием IgM, например, не приведет к распознаванию этим рецептором, поэтому данный вид иммуноглобулинов не относят к опсонинам [165]. При связывании с липосомами антитела должны ориентироваться определенным образом. Их неспецифическая адсорбция может не приводить к узнаванию Fc-рецептором, если константная область будет недоступна [164]. В ранних же работах, по данным авторов [166], уже кратковременная инкубация мультиламеллярных липидных везикул, покрытых агрегатами IgG с клетками, способствовала поглощению как моноцитами (~80% позитивных клеток), так и нейтрофилами (~30% позитивных клеток). Причем при проверке среди моноцитов, нейтрофилов, базофилов, эозинофилов и лимфоцитов, последние оставались инертными, а захват базофилами и эозинофилами был незначителен. Кроме того, авторы упоминают, что в крови фагоцитоз может происходить и за счет фибронектина, а также белков системы комплемента [166].

Еще один путь фагоцитоза липосом — через белки системы комплемента, которая включает в себя кроме семейства белков плазмы также и клеточные рецепторы. Система комплемента участвует в процессах воспаления, усиливает В и Т-клеточный иммунитет. Так, связывание протеолитических фрагментов имеет плейотропный эффект: продукты расщепления C3a и C5a могут вызывать воспаление при связывании с рецепторами на тучных клетках, а связывание с дендритными или Т-клетками усиливает Т-клеточный иммунитет [167]. Участие СК подтверждено экспериментами с сывороткой, обедненной компонентом C3. После инкубации липосом с такой сывороткой их захват моноцитами и нейтрофилами значительно снижается [168]. Рецепторы семейства регуляторов активации СК принадлежат к классу β_2 интегринов, они экспрессируются на многих клетках: моноцитах, нейтрофилах, макрофагах, дендритных и В-клетках.

Они связывают продукты расщепления C3 (или C4, при развитии классического пути активации СК), предотвращая дальнейшее развитие каскада [167].

Существует 4 вида рецепторов семейства регуляторов активации СК: CR1, CR2, CR3 и CR4. Рецептор CR1 ускоряет расщепление C3 конвертазами классического и альтернативного путей и связывает C3b и C4b, он экспрессируется на эритроцитах, миелоидных клетках и лимфоцитах. Также он может выполнять роль кофактора для инактивации этих протеолитических фрагментов до iC3b и iC4b с участием фактора I [167], [169]. Полученный в результате такого расщепления фрагмент C3dg или C3d является лигандом другого рецептора этого семейства — CR2. Данный вид рецептора экспрессируется отдельной субпопуляцией лимфоцитов — В-клетками и фолликулярными дендритными клетками. У лимфоцитов он выполняет роль ко-рецептора для захвата опсонизированных липосом [164], [167] — [169].

Рецептор CR3 также связывает инактивированный фрагмент iC3b, однако сообщается, что его активность по отношению к лиганду в 3 раза выше, чем у CR1 [161]. В экспериментах с антителами к рецепторам CR1 и CR3 наблюдали, что анти-CR3 антитела приводят к концентрационно зависимому снижению поглощения липосом, тогда как анти-CR1 почти не влияют на поглощение (изменения не превышают 15%) [170]. Кроме того, он имеет дополнительный сайт для связывания лектинов, фибриногена и фактора H [169], [171]. Связанный с поверхностью фактор H, при распознавании CR3 рецептором на моноцитах и нейтрофилах, увеличивает адгезию клеток к поверхности данной НЧ и может ограничивать участок воспаления, ингибируя продукцию цитокинов [172], активных форм кислорода и хроматиновых ловушек нейтрофилов [171]. Важным свойством CR3 является влияние на другие рецепторы: он усиливает ответ рецептора иммуноглобулинов FcγR на собственный лиганд и, кроме того, вносит вклад в функционирование скавенджер-рецептора CD14 и β₁-интегринов [173]. Рецептор CR4 является близким гомологом CR3 как по структуре, так и по функциям. Он также обладает несколькими сайтами связывания для целевого

фрагмента iC3b, липополисахаридов и фибриногена. Тем не менее, сайт связывания iC3b отличается от аналога CR3. Оба рецептора экспрессируются миелоидными клетками, степень их участия в фагоцитозе может варьировать в зависимости от типа клеток, но количество CR3 на поверхности как моноцитов, так и нейтрофилов больше количества CR4 почти на порядок [173]. Таким образом, CR3 является главным рецептором для узнавания опсоинов СК на поверхности липосом [170]. Наночастица со связанным компонентом iC3b вызывает кластеризацию рецепторов CR3 на поверхности моноцитов для усиления чувствительности и ответа на данный сигнал. Такое поведение рецепторов приводит к активации транскрипционного фактора NF-κB и экспрессии генов провоспалительных цитокинов [100].

Обычно интегрины находятся на поверхности мембраны в неактивированном состоянии, что позволяет лейкоцитам спокойно циркулировать в кровяном русле. При наличии стимула они претерпевают конформационные изменения. Данный стимул может исходить как извне, так и из цитоплазмы, что приводит в движение находящиеся в цитоплазме части субъединиц рецепторов [173]. К активации интегринов на моноцитах, без увеличения их количества на поверхности клетки, может привести связывание фибронектина или сывороточного амилоидного компонента Р липосомами, при этом растворенный в сыворотке фибронектин не влияет на состояние рецепторов [161]. Авторами [170] для нейтрофилов было установлено стимулирующее действие компонента C5a и фактора некроза опухоли на поглощение липосом, причем наблюдалось увеличение числа рецепторов. В отсутствие компонента C5a в сыворотке уровень поглощения липосом нейтрофилами сильно снижался, при этом добавление C5a увеличивало процент позитивных клеток [170].

Для узнавания рецепторами опсоинов СК важную роль играет характер взаимодействия фрагментов C3b с поверхностью липосом. Нековалентное взаимодействие C3b и iC3b не вызывает фагоцитоз, а при образовании ковалентной связи между тиоэфирной группой в C3 и, например, гидроксильной

группой на поверхности НЧ возможно распознавание рецептором. При этом очевидно, что ковалентно связанные фрагменты должны оставаться доступными для взаимодействия с рецептором на поверхности активированной клетки, например, анафилатоксинами. Активация переводит рецепторы в функционально активное состояние [174].

В связи с тем, что отрицательно заряженные липосомы эффективно поглощаются моноцитами и нейтрофилами, было предложено использовать эти клетки в качестве транспортеров лекарств в мозг [175]. Инкапсулированное в липосомы лекарство будет фагоцитироваться клетками вместе с системой доставки. Поглощение липосомы должно происходить непосредственно в кровотоке, кроме того, она не должна метаболизироваться в лизосомах, чтобы лекарство высвобождалось уже в мозге. Например, для липосом из дистеароилфосфатидилхолина с добавлением холестерина и дистеароилфосфатидилглицерина показали возможность доставки инкапсулированного серотонина в мозг с помощью активированных моноцитов. Липосомы поглощались около 60% моноцитов и 30% нейтрофилов, что по данным авторов способствовало увеличению количества серотонина, доставленного в мозг животных в нормальных физиологических условиях [175]. Предложенная концепция накладывает на систему доставки ограничения по размеру — от 100 до 250 нм, чтобы попасть в миелоидные клетки, — и заряду (только отрицательно заряженные). На мышинных моделях меланомы и рака груди установили, что нейтрофилы могут проникать через слой эндотелиальных клеток сосуда в опухоль, в ходе её роста [176]. Если рассматривать это явление как ещё один способ транспорта НЧ, то необходимо повышать захват систем доставки нейтрофилами. Можно также использовать нацеливание на моноциты — модификацию поверхности НЧ, в том числе липосом, рецептор-специфическими антителами [173], [175]. Другой подход к нацеливанию — модификация поверхности липосом PEG-цепями с пиридилдитиопропионильными группами для селективного связывания с большим количеством C3b. Сильно

опсонизированная поверхность будет привлекать большее количество моноцитов [177]. К недостаткам такой концепции можно отнести миграцию моноцитов в ткани РЭС и дальнейшую дифференцировку в резидентные макрофаги легких, печени и селезенки [160].

Вводимые в кровоток системы доставки могут влиять на гемостаз. Система гемостаза защищает организм от потери крови при повреждении сосудов. К ней относятся эндотелиальные клетки стенок сосудов, тромбоциты и растворимые белки плазмы. При повреждении стенки сосуда эндотелиальные клетки высвобождают фактор фон Виллебранда, который активирует тромбоциты и провоцирует их связывание с поврежденным участком. После связывания тромбоцитов запускается проферментно-ферментный каскад коагуляции, завершающийся образованием фибринового сгустка-тромба.

Воздействие липосом на систему коагуляции проявляется в значительно меньшей степени, в сравнении с другими наноматериалами. По данным различных исследователей, в высоких концентрациях липосомы могут взаимодействовать с тромбоцитами как напрямую, так и посредством вовлечения различных факторов системы коагуляции, не вызывая коагуляции вовсе [178], [179] или создавая слабые агрегаты, образование которых обратимо [163], [180], [181]. Сообщается, что тромбоциты могут обмениваться липидами с бислоем липосом и переносить белки мембраны клетки на липосомы. Такое воздействие на бислой липосом может негативно повлиять на доставку инкапсулированного вещества [182]–[185]. Данные о влиянии липосом на агрегацию тромбоцитов довольно разрозненны. Предполагали, что они могут ингибировать или усиливать агрегацию клеток в зависимости от знака заряда. Однако о противоположном действии на тромбоциты сообщается даже для различных липосом с одинаковым зарядом [186].

Опсонины белковой короны кроме привлечения моноцитов и нейтрофилов способны влиять и на тромбоциты. Лизирующий мембрану комплекс C5b-9

активирует тромбоциты и стимулирует секрецию цитокинов эндотелиальными клетками, что является сигналом к связыванию тромбоцитов с поверхностью и агрегации. Калликреин, тромбин и факторы IXa, Xa, XIa активируют белок C3. Образующиеся анафилотоксины C3a и C5a вызывают экспонирование P-селектинов и продукцию фактора фон Виллебранда эндотелиальными клетками, а также продукцию тромбоцитами тканевого фактора, который активирует внешний путь коагуляции и привлекает нейтрофилы [187]. Агрегаты тромбоцитов, к тому же, сами стимулируют образование C3a и C5a, создавая петлю усиления для коагуляции [186]. Кроме того, тромбоциты экспрессируют один из рецепторов к константной области иммуноглобулинов (FcγR), что позволяет им распознавать IgG в белковой короне и тоже способствует агрегации. Взаимодействие компонентов систем коагуляции и комплемента в присутствии системы доставки может приводить к развитию нежелательного воспаления и формированию сгустка в отсутствие необходимости тромбообразования. К побочным эффектам при нарушении равновесия между системами фибринолиза и коагуляции относятся возникновение аутоиммунных реакций, развитие сердечно-сосудистых заболеваний и воспалений.

Другой важный аспект гемосовместимости наночастиц — инертность в отношении эритроцитов. Несовместимые с кровью частицы вызывают деформацию и разрушение мембраны эритроцитов, изменение паттерна распределение фосфатидилсерина в ней, агрегацию эритроцитов и вязкость самой крови. Форма эритроцитов определяет их движение в кровотоке, направляя эритроциты в центр потока крови и выталкивая тромбоциты ближе к стенкам сосудов для взаимодействия с эндотелиальными клетками. Изменение этих реологических характеристик влияет на гемостаз — способность тромбоцитов к агрегации [188]. Липосомы различного заряда, приготовленные на основе природных фосфолипидов — фосфатидилхолина, холестерина, сфингомиелина, фосфатидилсерина или фосфатидилглицерина — не вызывают значимого уровня гемолиза эритроцитов. В экспериментах авторов на цельной крови и на

выделенных клетках [178], [189], [190] уровень разрушения эритроцитов не превышал 2% от всей популяции клеток. Установлено также, что липосомы могут использоваться эритроцитами в качестве источника липидов для обновления мембраны [191], что замедляет собственный гемолиз эритроцитов [192]. Обновление липидов мембраны эритроцитов *in vivo* происходит за счет липопротеинов, сами они не синтезируют липиды. При хранении клеток без источника новых липидов у эритроцитов наблюдают деформацию мембраны, изменение её жидкостности и гемолиз. Добавление липосом на основе фосфатидилхолина положительно влияет на сохранность эритроцитов, так как их мембрана обновляется за счёт липосом [193], [194]. Такие взаимодействия надо учитывать при использовании липосом в качестве носителей лекарств. С другой стороны, пустые липосомы могут использоваться для сохранения эритроцитов, предназначенных для переливания.

2.4. Методы изучения белковой короны

Характеристика короны наночастицы необходима для предсказания возможных последствий при введении НЧ в организм. Исследователи изучают кинетику и механизмы образования, а также состав короны, изменяя сами объекты и условия. Разнообразие методов анализа и экспериментальных условий привело к накоплению неоднородных данных, из которых пока не удастся выявить все возможные закономерности для точного предсказания поведения системы доставки в организме. В экспериментах варьируют целый ряд условий [42], [63]:

1. источник белка (индивидуальный раствор белка, бычья фетальная сыворотка, сыворотка крови человека или мыши, плазма крови человека или мыши);

2. среду проведения (*in vivo* введение липосом и других НЧ экспериментальным животным с последующим выделением из крови, *ex vivo*

инкубация с предварительно выделенной донорской сывороткой/плазмой, *in vitro* в условиях близких к физиологическим);

3. концентрацию плазмы/сыворотки или отдельных белков;
4. скорость течения жидкости (статические условия или моделирование потока крови);
5. характеристики систем доставки (размер, заряд, состав, ламеллярность для липосом);
6. количественное соотношение плазмы/сыворотки/индивидуального белка и липосом/наночастиц;
7. время взаимодействия (от минут до часов);
8. методы анализа короны в условиях *in situ* или после выделения.

Каждое из условий существенно влияет на результат эксперимента. Например, в ранних исследованиях зачастую использовались мультиламеллярные везикулы как модель бислоя, с которым связываются белки. Данная модель была довольно проста для последующих манипуляций, например, отделения комплексов от раствора несвязавшихся белков. Но по своим физико-химическим характеристикам она сильно отличается от моноламеллярных везикул, как малых, так и больших, и не может предсказывать поведение таких везикул в кровотоке вследствие больших различий в связывании белков из-за менее развитой (относительно массы липидов) поверхности [130].

При проведении эксперимента *in vivo* наблюдается сложный профиль белков, ассоциированных с поверхностью липосом [195]. Для имитации физиологических условий в экспериментах *in vitro* обычно используют избыток компонентов плазмы по отношению к поверхности НЧ и в некоторых случаях моделируют поток жидкости [196]. Препараты очищенных белков или же разбавленные растворы плазмы используют при установлении констант диссоциации белков, что позволяет оценить качественный состав «жесткой» белковой короны [122], [131].

Независимо от используемого источника белка, сформированная корона находится в динамическом равновесии с инкубационной средой. Анализ стабильной белковой короны необходимо проводить после завершения основных изменений в составе. В ходе анализа стремятся максимально сохранить естественную корону наноносителя. Однако информация, которую можно получить *in situ* в среде, ограничена из-за фонового сигнала свободных белков. Например, метод поверхностного плазмонного резонанса позволяет определять константы связывания различных белков с поверхностью липосом и изучать механизмы их взаимодействия: белок иммобилизован на поверхности сенсора в зоне измерения, а образец вводится в проточную ячейку [197], [198]. Оценить толщину белковой короны *in situ* в сравнении с исходными наноносителями возможно методами сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии [56]. Все методы выделения липосом-белковых комплексов влияют на равновесие в короне и, как полагают, не позволяют полноценно анализировать слабо связанные белки — компоненты мягкой короны. Есть мнение также, что процесс десорбции высокоаффинных белков жесткой короны может происходить неполно [199].

Методы выделения комплексов липосом (и других наночастиц) с белковой короной основаны на принципах хроматографии или осаждения. Для выделения только сильно связанных белков жесткой короны подходит ультрацентрифугирование. После первого осаждения в ходе повторяющихся промывок равновесие в белковой короне будет устанавливаться заново и слабо связанные белки перейдут в отбрасываемый супернатант [53]. При переходе в осадок комплексы липосом с короной останутся в небольшом объеме среды, содержащей свободные белки. Чтобы в ходе анализа не захватить примесь свободных белков, центрифугирование проводят в присутствии «сахарозной подушки». Образец наслаивается сверху на 0.7М раствор сахарозы и не смешивается из-за различных плотностей, вся система центрифугируется. В ходе разделения комплексы высаживаются в «сахарозную подушку», а свободные

белки остаются в верхнем слое жидкости [200]. В усложненной системе для разделения увеличивают количество слоев с разной плотностью - создают градиент. Для разделения в градиенте плотности используют растворы сахарозы или хлорида цезия. Эффективность метода зависит от характеристик липосом и, вместе с тем, от условий разделения – времени, скорости, объема образца и температуры разделения. Так, при постановке эксперимента с использованием различных методик создания градиента, результаты для одного и того же исследуемого препарата могут отличаться [201].

При отделении малых моноламеллярных везикул (до 100 нм) применяют многократное центрифугирование при ускорении до 500 000 g. Для отделения крупных мультламеллярных везикул используют меньшие ускорения (до 30 000 g) из-за большей плотности липосом [122]. При использовании ультрацентрифугирования на получаемое значение связанного в комплекс белка влияет полнота промывки от свободных компонентов. Многократное промывание липосом приводит к определению прочно ассоциированных белков, а менее тщательное – к увеличению вклада слабо связанных белков, присутствующих в плазме в избытке [122].

Другой способ разделения комплексов и свободных белков плазмы — в соответствии с гидродинамическим радиусом — включает различные хроматографические методики. Наиболее часто применяемым методом отделения липосом-белковых комплексов от свободных белков служит гель-проникающая хроматография, в ходе которой в комплексе остаются только белки жесткой короны. Профиль элюции индивидуального белка зависит от скорости диссоциации комплекса, времени и скорости протекания хроматографии. При быстром обмене определенным белком со средой, то есть при его низкой аффинности к поверхности НЧ, профиль элюции при нанесении на колонку совместно с комплексом не изменится. Медленно диссоциирующие белки будут элюироваться вместе с НЧ в составе комплекса [202]. Матрицей обычно выступает кросс-сшитая сефароза 2В или 4В ([52], [203], [204]), сефадекс 75G

[205], а также BioGel-A 15m ([147], [206]). Для минимизации сорбции липосом-белковых комплексов на гелевой матрице применяют буфер с высокой ионной силой (> 20 мМ). Данный метод позволяет выделить комплексы, образованные в первые секунды инкубации [52], но он трудоемок и требует большого количества образца.

Избежать недостатков классического метода позволяют спин-хроматография и гель-хроматография под высоким давлением. В методе спин-хроматографии осуществляется низкоскоростное центрифугирование небольшой колонки с фазой, и разделение по размерам происходит при синергии силы тяжести и центробежного ускорения [143], [195], [206]. Высокая эффективность данного метода способствует его применению для разделения липосомальных образцов со сложной матрицей. Гель-хроматография под высоким давлением дает еще одно преимущество – позволяет отделять липосомы не только от свободных белков, но и от липопротеинов крови, размер которых соответствует размеру липосом, одобренных для клинического применения [207].

Также к хроматографическим можно отнести метод фракционирования наночастиц в ассиметричном потоке (asymmetrical flow field-flow fractionation, AF4) [208]. В отличие от классической хроматографии в методе AF4 нет неподвижной фазы. Разделение происходит в ламинарном потоке под действием прилагаемого перпендикулярно второго потока жидкости. Скорости обоих потоков регулируются в соответствии с необходимой силой воздействия. Элюирование частиц происходит от меньшего размера к большему (в противоположность гель-хроматографии). Данный метод позволяет разделять частицы с радиусом от 1 до 1000 нм. В AF4 создаются мягкие условия разделения компонентов смеси, позволяющие наблюдать даже агрегаты белков [209]. Дополнительно, на основании времени удерживания частицы в ячейке рассчитывается размер этой частицы [210].

Общее количество белка, ассоциированного с поверхностью липосом, определяют с помощью метода Лоури с учетом присутствия больших количеств липидов [130], [211], по методу Брэдфорд [76], [212] или с помощью изотермической титрационной калориметрии (ИТС) [74]. В методе ИТС, при добавлении белка калориметр регистрирует выделение тепла в процессе связывания с поверхностью. Этот метод, как и метод поверхностного плазмонного резонанса используют при изучении аффинности связывания отдельных белков: альбумина, аполипопротеинов, фибриногена [27 с. 15-16], [213]. Толщину белковой короны после выделения комплексов оценивают методами динамического лазерного светорассеяния (DLS) и анализа траектории наночастиц (NTA). Исследователи сравнивают размеры исходных частиц и выделенных комплексов [55], [74].

Кроме аффинности, для отдельных белков изучают изменение конформации при сорбции на поверхности НЧ. Для подобных исследований используют методы спектроскопии кругового дихроизма (КД), инфракрасную спектроскопию с преобразованием Фурье (ИК, FTIR), двумерный ядерный магнитный резонанс (ЯМР, 2D NMR). Первые два вида спектроскопии позволяют оценить изменение количества элементов вторичной структуры белка, каждый из которых имеет собственный характеристический спектр. Однако, спектроскопии КД и ИК не дают информации об изменениях в положении отдельных аминокислот. К недостаткам метода двумерного ЯМР относят дороговизну и сложность проведения анализа [56]. Метод ИК-спектроскопии удобен тем, что позволяет отслеживать изменения как в структуре белке [34],[214], так и в липосомах [215].

Заключительный этап анализа белковой короны – идентификация ассоциированных белков. Для этих целей используют электрофорез ([52], [128], [143]); масс-спектрометрию ([97], [216], [217]); иммуноферментный анализ ([21], [143]) и иммуноблоттинг ([147], [218], [219]). Электрофорез — быстрый, дешевый и доступный метод. Визуализацию белков проводят с помощью окрашивания геля трифенилметановым красителем кумасси или более чувствительным реагентом

— аммиачным комплексом серебра [220]. Одномерный электрофорез после визуализации даёт информацию только о массах белков. Качественный анализ белков в геле проводят при помощи иммуноблоттинга или масс-спектрометрии отдельных полос. Иммуноблоттинг применяют для точного определения конкретного белка и изучения его структурных изменений, поскольку продукты протеолиза и распада на субъединицы детектируются антителами. Эти изменения могут происходить на поверхности наночастицы, что очевидно, если части белка не детектируются в донорской плазме. Однако методики анализа с разделением белков в геле не позволяют оценить полный состав короны, насчитывающий более 100 компонентов. Для получения информации о суммарном составе белковой короны используют масс-спектрометрию [32]. Сопряжение жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии объединяет достоинства и возможности обоих методов и удобно для пользователя [42], [200].

2.5. Заключение

В заключение обзора литературы можно сделать вывод, что, несмотря на то, что для ряда наноразмерных систем доставки лекарств определены параметры образования белковой короны и механизмы распознавания её компонентов клетками, эти данные не позволяют создать прогностическую модель, однозначно связывающую характеристики наночастицы и её путь в организме. К тому же, исследователи только начинают изучать небелковую часть короны, имеются лишь единичные публикации о её влиянии на поведение НЧ (например, [221]).

Взаимодействия с белками плазмы крови описаны для липосом определенного состава (например, [48], [91], [137], [145], [168]). Основываясь на этих данных, в настоящей работе мы исследовали наиболее критичные последствия образования белковой короны, к которым можно отнести опсонизацию и дестабилизацию мембраны, для противоопухолевых липосом с липофильными пролекарствами двух химиотерапевтических препаратов.

3. Материалы и методы

3.1. Материалы

Липиды и их производные

Диглицеридный конъюгат мелфалана 1,2-диолеоил-3-{4-[бис(2-хлорэтил)-амино]-*L*-фенилаланин}-*sn*-глицерин (MlphDG) синтезирован в лаборатории химии липидов ИБХ РАН, как описано [223]. Использовали фосфатидилхолин из яичного желтка (ePC) фармакопейной чистоты USP производства Lipoid GmbH (Heidelberg, Germany); фосфатидилинозит-сырец из сои (PI), предоставленный фирмой Lipoid, очищали колоночной хроматографией; дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), холестерин (Chol) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (PEG-PE) производства Avanti Polar Lipids (США). 1,3,5,7-тетраметил-BODIPY-меченый фосфатидилхолин (TMB-PC) [224], бис-циклогексил-BODIPY-меченый фосфатидилхолин (BCHB-PC) [225], 3-периленоильное производное липофильного конъюгата мелфалана (Per-MlphDG) [226] синтезированы и любезно предоставлены И.А. Болдыревым (ИБХ РАН). Конъюгат фосфолипида с N-карбоксилированным олигоглицином (CMG-PE) синтезирован из прекурсора [227] и любезно предоставлен А.Б. Тузиковым (ИБХ РАН), ганглиозид GM₁ выделен из мозга крупного рогатого скота и любезно предоставлен И.И. Михалевым (ИБХ РАН).

Носители для хроматографии

Сефароза CL-4B (Pharmacia, США)

Сефадекс G-50 (Pharmacia, США)

Сефадекс LH-20 (Pharmacia, США)

Дауэкс (Pharmacia, США)

пластинки для ТСХ с Kieselgel 60 или Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merk, Германия)

Белки

альбумин лиофилизированный из человеческой сыворотки (HSA; Reanal, Венгрия)

альбумин лиофилизированный из бычьей сыворотки BSA, (ПанЭко, Россия)

набор пред-окрашенных маркеров молекулярных масс белков (Thermo Fisher Scientific, США)

Антитела

первичные :

козьи поликлональные к белку C3 системы комплемента (ComplementTech, США)

козьи поликлональные к фактору Н системы комплемента (ComplementTech, США)

овечьи поликлональные к C4b связывающему белку системы комплемента (AbCam, США)

козьи поликлональные к иммуноглобулинам IgM (ИМТЕК, Россия)

козьи поликлональные к иммуноглобулинам IgG (ИМТЕК, Россия)

козьи к иммуноглобулинам IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Santa Cruz Biotechnology, США)

вторичные:

кроличьи к козьим и овечьим иммуноглобулинам IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, США)

козьи к кроличьим и мышинным иммуноглобулинам IgG (Sigma, США)

Растворители и другие реактивы

метиловый спирт перегнанный, MeOH

этиловый спирт технический перегнанный, EtOH

хлороформ перегнанный, CHCl₃

ацетон (ЭКОС-1, Россия)

гексан (ЭКОС-1, Россия)

диметилсульфоксид, DMSO (Merck, Германия)

изопропиловый спирт (ЭКОС-1, Россия)

тетрахлорметан, CCl_4 (ЭКОС-1, Россия)
дициклогексилкарбодиимид, ДЦК (Sigma, США)
соляная кислота, HCl (Россия)
уксусная кислота, CH_3COOH (Россия)
концентрированный раствор аммиака (28%-ный; Россия)
гидроксид натрия, NaOH (ХИММЕД, Россия)
гидрофосфат натрия, Na_2HPO_4 (Реахим, Россия)
гидрокарбонат натрия, NaHCO_3 (Реахим, Россия)
дигидрофосфат калия, KH_2PO_4 (Реахим, Россия)
дигидрофосфат натрия двухводный, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Реахим, Россия)
карбонат цезия, Cs_2CO_3 (Реахим, Россия)
карбонат натрия, Na_2CO_3 (Реахим, Россия)
нитрат серебра, AgNO_3 (Уральский завод химических реактивов, Россия)
персульфат аммония, PSA (Reanal, Венгрия)
сульфат меди, CuSO_4 (Реахим, Россия)
тарtrat натрия-калия, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ (Реахим, Россия)
тиосульфат натрия, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Реахим, Россия)
хлорид калия, KCl (ХИММЕД, Россия)
хлорид натрия, NaCl (ХИММЕД, Россия)
хлорид аммония, NH_4Cl (Реахим, Россия)
додецилсульфат натрия, SDS (Merk, Германия)
Tween 20 (Sigma, США)
Triton X-100 (Sigma, США)
акриламид (BDH Laboratory Reagents, Англия)
бис-акриламид (Fluka, Швейцария)
глицин (ХИММЕД, Россия)
 β -меркаптоэтанол (Loba Feinchemie, Австрия)
N,N,N',N'-тетраметилэтан-1,2-диамин, TEMED (Reanal, Венгрия)
2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол, Tris (Sigma, США)
реагент Фолина-Чокальтеу (Sigma, США)

этилендиаминтетрауксусная кислота, EDTA (Sigma, США)
этиленгликоль-бис(2-этиламино)тетраацетат, EGTA (Fluka, Швейцария)
кристаллический фиолетовый, (Serva, Германия)
кальцеин, тетранатриевая соль (Serva, Германия)
метотрексат (Teva, Израиль)
йодуксусная кислота (Реахим, Россия)
n-нитрофенол (Синбиас, Донецк, Украина)

Растворители очищали стандартными методами; упаривания на роторном испарителе проводили при температурах не выше 40 С.

Буферы готовили на бидистиллированной воде (H_2O_{dd}): PBS, PBS с 1 мМ EDTA, pH 7.4 — фосфатно-солевой буфер (KH_2PO_4 , 0.2 г/л; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 0.15 г/л; Na_2HPO_4 , 1.0 г/л; KCl, 0.2 г/л; NaCl, 8.0 г/л); лизирующий буфер (NH_4Cl , 155 мМ; $NaHCO_3$, 12 мМ; EDTA, 0.1 мМ).

Образцы крови здоровых доноров-волонтеров собирали в вакуумные пробирки (Vacuette, Greiner Bio-One, Германия), которые в качестве антикоагулянтов содержали гепарин лития или EDTA (в зависимости от условий конкретного эксперимента). Для получения сыворотки использовали пробирки Vacutest (VacutestKima, Италия)

3.2. Методы

3.2.1. Синтез липофильного производного метотрексата

Липофильное производное метотрексата было синтезировано по методике, описанной ранее [222].

***n*-Нитрофениловый эфир йодуксусной кислоты (I).** Йодуксусную кислоту (3.5 г, 18.8 ммоль) растворяли в 20 мл сухого хлороформа, прибавляли раствор *n*-нитрофенола (3.2 г, 23 ммоль) в сухом хлороформе (30 мл) и медленно прикапывали 8 мл 2.5 М раствора дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) в CCl_4 , охлаждая реакционную смесь на ледяной бане, затем добавили еще 5 мл диизопропилкарбодиимида. Реакционную смесь оставляли при охлаждении и перемешивании на ночь. Далее отделяли образовавшуюся дициклогексилмочевину фильтрованием через вату, фильтрат упаривали на роторном испарителе. Остаток растворяли в этилацетате, отфильтровывали осадок (дициклогексилмочевины) на стеклянном фильтре, фильтрат упаривали. К остатку добавляли гексан, осадок растирали и декантировали раствор. Осадок досушивали на роторном испарителе и растворяли в 20 мл ацетона с 1% CH_3COOH . Добавляли к раствору при перемешивании воду с 1% CH_3COOH до выпадения желтого осадка. Осадок отфильтровывали, высушивали и перекристаллизовывали из этанола при охлаждении до $-70^\circ C$. Образовались слегка желтоватые пластинчатые рыхлые пушистые кристаллы. Выход 2.68 г (44 %). Продукт по хроматографической подвижности совпадал с аутентичным веществом. Температура плавления $79-80^\circ C$. $T_{пл.}$ (лит.) = $80^\circ C$ [Fluka Chemie AG RdH Laborchemikalien GmbH & Co KG].

***n*-Нитрофеноксикарбонилметилметотрексат (II).** Метотрексат (МТХ) перед модификацией выделяли из фармакопейного препарата, освобождая от ионов натрия на колонке с катионообменной смолой Дауэкс, уравновешенной 1 М Py в $MeOH-H_2O$, 1:1. Фракции с МТХ упаривали и сушили при 5 Па. К раствору 510

мг пиридиниевой соли МТХ (1 ммоль) в 15 мл сухого DMSO прибавляли 327 мг (1 ммоль) свежепрокалённого Cs_2CO_3 , перемешивали в течение 3.5 ч. К образовавшейся суспензии цезиевой соли МТХ прибавляли 460 мг (1.5 ммоль) йодацетата *n*-нитрофенола (**I**). Перемешивали 20 минут, затем добавляли 2% уксусной кислоты от общего объема, чтобы остановить реакцию и нейтрализовать Cs^+ , так как продукт реакции чувствителен к рН. Переносили полученную смесь в колбу на 500 мл, добавляли 250 мл диметилового эфира с 1% уксусной кислоты, перемешивали, декантировали, промывали эфиром несколько раз и упаривали на роторе. Далее приливали 300 мл системы $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-CH}_3\text{COOH}$, 70:30:4:2, порциями, растворяли на УЗ-бане в течение 30 мин после каждого добавление системы. Так как в ходе реакции образуется множество побочных продуктов и остается непрореагировавшее вещество проводили отделение целевого продукта на колонке с силикагелем. Сначала к раствору смеси добавляли 10 г диатомовой земли Supercel, перемешивали и упаривали на роторе. После лиофилизации суспендировали в хлороформе и наносили на колонку с силикагелем; элюировали системами на основе смеси $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O-CH}_3\text{COOH}$, 85:15:1:1, в градиенте метанола до 30 %. Фракции, содержащие продукт, упаривали с толуолом для освобождения от уксусной кислоты, сушили при 5 Па. Получили ок. 500 мг аморфного желтого порошка, содержащего, по данным ТСХ, большую часть продукта с примесями (R_f основного вещества, 0.36, совпадает с аутентичным свидетелем в системе хлороформ–метанол–вода, 65 : 35 : 4). Продукт использовали далее без очистки.

***rac*-1,2-Диолеилглицеро-3-(β-аланил-N-карбонилметил)-метотрексат (III).**

Продукт (**II**), 150 мг, растворяли в 2 мл DMSO. При перемешивании прибавляли 158 мг (~0.21 ммоль) *rac*-1,2-диолеил-3-(3'-аминопропионил)глицерина в 1 мл DMSO и 30 мкл (0.22 ммоль) TEA. Перемешивали 1.5 ч, контролируя рН (~8). Замораживали смесь в жидком азоте и частично высушивали при 5 Па. Для отделения от следов DMSO и других примесей с меньшей молекулярной массой (МТХ, остатки продукта (**II**) и др.), остаток подвергали гель-фильтрации на

колонке с сефадексом LH-20 (90 мл) в системе хлороформ–метанол, 1 : 1. Частично очищенный продукт (125 мг) хроматографировали на колонке с 12 г силикагеля (40–63 мкм), элюируя градиентом метанола в хлороформе с 1 % CH_3COOH и 1% воды (10 → 20%). Получили 50 мг (42 мкмоль) продукта (**III**) в виде желтого маслообразного вещества, индивидуального хроматографически по данным ТСХ ($R_f = 0.33$, хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4). Выход 20 %.

^1H -ЯМР (d, м.д.; КССВ — J, Гц; в d_6 -DMSO): 0.84 (т, 6 H, 2CH_3), 1.23 (уш. м, 40 H, C4-C7 и C12-C17), 1.49 (уш. м, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 1.96 (уш. м, 8 H, $\text{CH}_2\text{-CH=CH}$, 1 H $\text{CH}_2\text{CHCO Glu}$), 2.05 (м, 1 H $\text{CH}_2\text{CHCO Glu}$), 2.26 (уш. т, 6 H, CH_2CO), 2.44 (т, 2 H, $\text{NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.20 (с, 3 H, NMe), 4.09-4.36 (набор м, 7 H, OCH_2CO , NHCHCO , H1 и H3 Gro), 4.78 (с, 2 H, CH_2NMe), 5.19 (уш. м, 1 H, H2 Gro), 5.31 (уш. м, 4 H, CH=CH), 6.58 (уш. с, 2 H, NH_2), 6.81 (д, 2 H, Ph, 1J 8.8), 7.38 (уш. с, 1 H, NH_2), 7.63 (уш. с, 1 H, NH_2), 7.74 (д, 2 H, Ph, 1J 8.8), 8.36 (д, 1 H, NH Glu , 3J 6.9), 8.56 (с, 1 H, H7 MTX).

УФ-спектр (этанол), λ_{max} , нм (ϵ): 260 (23670), 302 (25000), 376 (7996).

Масс-спектр: m/z 1186.48 [$\text{M}^+\text{+H}$].

3.2.2. Получение липосом

Липосомы получали методом экструзии как описано ранее [15], [20], [22]. Смеси фосфолипидов, MTXDG или MlphDG и других компонентов мембран в требуемых соотношениях упаривали в круглодонных пробирках из растворов в хлороформе-метаноле (2:1) на роторном испарителе и выдерживали 40 мин при 7 Па (лиофильная сушилка «ИНЕЙ-4»; ИБП РАН, Россия). Составы липидных пленок (мол./мол.) были следующие: ePC–MTXDG, 9 : 1; ePC–MlphDG, 9 : 1; DSPC–MlphDG, 9 : 1; ePC–MTXDG–PI, 8 : 1 : 1; ePC–MlphDG–PI, 8 : 1 : 1; ePC–MTXDG–GM₁, 8 : 1 : 1; ePC–MlphDG–GM₁, 8 : 1 : 1 или 8.8 : 1 : 0.2; ePC–MTXDG–CMG-PE, 8 : 1 : 1; ePC–MlphDG–CMG-PE, 8 : 1 : 1 или 8.8 : 1 : 0.2; ePC–

MlphDG–PEG-PE, 8 : 1 : 1 или 8.8 : 1 : 0.2; DSPC–MlphDG–PEG-PE, 8 : 1 : 1 или 8.8 : 1 : 0.2; DSPC–Chol–MlphDG–PEG-PE, 5 : 3 : 1 : 1 или 5.8 : 3 : 1 : 0.2, а также «пустые» образцы ePC, DSPC, ePC–PI, 9 : 1; ePC–GM₁, 9 : 1, ePC–CMG-PE, 9 : 1, DSPC–Chol–PEG-PE, 6 : 3 : 1. Все композиции, предназначенные для инкубации с лейкоцитами крови, содержали также 1 мол. % TMB-PC; композиции, предназначенные для анализа связывания белков по эффективности переноса энергии между зондами, содержали 0.5 мол. % TMB-PC и 1.5 мол. % BCHB-PC. Липидные пленки гидратировали 2 ч при комнатной температуре в PBS (в случае липосом с MTXDG с 1 mM EDTA), встряхивали для получения суспензии, затем подвергали 10-кратной процедуре замораживания – оттаивания (жидкий азот – +40 °C) и продавливали 10 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (Nucleopore, США) с размером пор 100 нм с помощью установки Mini-extruder от Avanti Polar Lipids (США). Для получения образцов с раствором кальцеина в самозатухенной концентрации во внутреннем водном объеме липосом, липидные пленки гидратировали 80 mM раствором кальцеина в PBS. Липосомы готовили как описано выше. После экструзии 100 нм липосомы отделяли от невключенного раствора кальцеина методом гель-эксклюзионной хроматографии на колонке Sephadex G-50 (1.3 × 18 см, V₀ = 4.5 мл), уравновешенной PBS. Наносили 200 мкл липосомальной дисперсии и собирали фракции объемом 150-200 мкл. Объединяли 3-4 фракции с максимальным содержанием пролекарства.

Концентрацию MTXDG, MlphDG или кальцеина в дисперсиях липосом определяли спектрофотометрически (прибор СФ-2000 Ломофотоника, С.-Петербург) после разрушения липосом 20-кратным разбавлением в этаноле (MTXDG: $\lambda_{\max} = 302$ нм, $\varepsilon \sim 25000$ M⁻¹cm⁻¹; MlphDG: $\lambda_{\max} = 259$ нм, $\varepsilon \sim 17300$ M⁻¹cm⁻¹, кальцеин: $\lambda_{\max} = 504$ нм, $\varepsilon \sim 74000$ M⁻¹cm⁻¹).

3.2.3. Инкубация липосом с цельной кровью, подготовка образцов для цитометрии

К 100 мкл цельной крови (отбиралась в пробирки с гепарином лития Vacuette, Greiner Bio-One, Германия) добавляли аликвоту 5 мкл образца 10 мМ липосом, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30 и 60 мин. В качестве контроля к 100 мкл цельной крови добавляли 5 мкл PBS/EDTA. После инкубации образцы разбавляли 3 мл холодного PBS (+4°C) для остановки фагоцитоза, интенсивно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 250 g. Супернатант отбрасывали, добавляли 1 мл холодного лизирующего буфера (+4°C), перемешивали и оставляли на 1 ч в темноте при +4°C и периодическом перемешивании. Непосредственно перед измерениями для тушения флуоресценции на клеточной поверхности добавляли аликвоту водного раствора кристаллического фиолетового до конечной концентрации 0.1 мг/мл и интенсивно перемешивали. Образцы готовили в двух повторах.

3.2.4 Проточная цитометрия

Измерения окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA, Florida). Целевые популяции лейкоцитов периферической крови (лимфоциты, моноциты, гранулоциты) выявляли путем введения логических ограничений в гистограммы распределения клеток по малоугловому (forward scatter) и боковому (side scatter) светорассеянию, и затем по отдельности анализировали на гистограммах по флуоресценции не менее 10^5 клеток. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного пакета CXP analysis (Beckman Coulter, USA, Florida).

3.2.5. Инкубации липосом с плазмой и выделение липосом-белковых комплексов

Кровь 4-6 здоровых доноров собирали в пробирки над EDTA или гепарином лития (для MTXDG содержащих образцов, аналогичных ранее использованным для работы с проточной цитофлуориметрией) в качестве антикоагулянта (Vacuette, Greiner Bio-One, Германия). Плазму отделяли от цельной крови центрифугированием 10 мин при 2000 g (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific, США). Надосадочные жидкости переносили в свежие пробирки и отделяли остатки тромбоцитов и других клеток центрифугированием 30 мин при 2000 об/мин при комнатной температуре (Sorvall RT 7 Plus, Thermo Fisher Scientific, США). Супернатанты объединяли, использовали сразу же или замораживали в жидком N₂ и хранили при -70°C. Липосомы (90 мкл) инкубировали с 360 мкл плазмы, однократно размороженной непосредственно перед инкубацией, при 37°C и слабом перемешивании в пробирках «Eppendorf» (Германия) (1.5 мл) 15 мин, если не указано другого. В качестве отрицательного контроля готовили образец плазмы с PBS/EDTA (4:1). Смесь наносили на колонку с сефарозой CL 4B (~1.1 x 19 см) и элюировали PBS, собирая фракции по ~400 мкл. К аликвотам фракций (80 мкл) добавляли 400 мкл EtOH, центрифугировали 10 мин при 9000 g (11000 об/мин, центрифуга Eppendorf), и супернатанты анализировали на содержание пролекарства спектрофотометрически (для MlphDG $\lambda_{\max} = 259$ нм, $\epsilon \sim 17300$ M⁻¹cm⁻¹; для MTXDG $\lambda_{\max} = 302$ нм, $\epsilon \sim 25000$ M⁻¹cm⁻¹). Параллельно 100 мкл каждой фракции отбирали для определения количества белка. Для каждого образца липосом эксперимент по выделению липосом-белковых комплексов проводили дважды.

Белок определяли с помощью модифицированного метода Лоури [228]. Реагент С готовили непосредственно перед использованием: к реагенту А (2% Na₂CO₃ + 0.4% NaOH + 0.26% NaKC₄H₄O₆ + 1% SDS в H₂O_{dd}) добавляли реагент В (4% раствор CuSO₄ в H₂O_{dd}), 100:1 (v/v). К 100 мкл анализируемого раствора добавляли 300 мкл реагента С, перемешивали и через 10 мин добавляли 30 мкл

реактива Фолина, разбавленного $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ 1 : 1. Через 60 мин измеряли оптическую плотность при 660 нм. Контрольный образец содержал 100 мкл PBS.

3.2.6. Делипидизация белковых фракций и электрофорез в ПААГ

Делипидизацию проводили как описано в работе [203]. К 100 мкл объединенных фракций липосом-белковых комплексов добавляли 400 мкл охлажденного MeOH, перемешивали, центрифугировали 3 мин при 9000 g. К раствору добавляли 200 мкл CHCl_3 , встряхивали на шейкере, центрифугировали 3 мин при 9000 g. После добавления к смеси 300 мкл $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$, встряхивания и центрифугирования 4 мин при 9000 g наблюдалось расслоение фаз, белок концентрировался на интерфазе. Отбрасывали ~700 мкл верхней фазы. К остатку добавляли ещё 300 мкл MeOH, перемешивали, центрифугировали 4 мин при 9000 g. Супернатант декантировали, оставляя ~30-50 мкл, которые упаривали досуха на роторном испарителе. К образцам добавляли по 36 мкл двукратного восстанавливающего буфера (0.075 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% глицерин, 2% SDS, 5% β -меркаптоэтанола, 0.01% бромфенолового синего), перемешивали и выдерживали на водяной бане (90-95°C) 2 x 2 мин, активно перемешивая. Электрофорез по Лэммли [229] проводили в 6%-м концентрирующем и 12%-м разделяющем геле на установке Helicon VE-2M (Россия): пред-форез — 6 мин, 10 мА; концентрирование – 20 мин, 18 мА; разделение — 40 мин, 28 мА. Белки визуализировали серебряным окрашиванием [230]. Электрофореграммы анализировали с помощью программы ImageJ. Для соотнесения молекулярных масс белковых полос использовали набор Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific, США).

3.2.7. Иммуноблоттинг

Белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану Immobilon-P (Merck Millipore, Германия) с помощью прибора для полусухого переноса (Semi-

dry; Helicon, Россия) в течение 30-40 мин при напряжении 35 В. После окончания переноса ополаскивали мембрану H_2O_{dd} , промывали буфером TBS (NaCl, 4.39 г; Tris, 3.03 г; H_2O_{dd} , 500 мл), pH 7.97, и для предотвращения неспецифической сорбции мембрану инкубировали в 5%-й суспензии обезжиренного сухого молока в буфере TBS, содержащем 0.1% Tween 20 (TBS/T), в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембрану промывали буфером TBS/T (3×5 мин) и инкубировали с первичными антителами (овечьи поликлональные антитела к C4b-связывающему белку человека, AbCam, США; козы антитела к компоненту C3 и фактору Н системы комплемента человека, ComplementTech, США; поликлональные козы антитела к иммуноглобулинам классов G и M, ИМТЕК, Россия) или с антителами к иммуноглобулинам класса G человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (козы антитела, Santa Cruz Biotechnology, США) в 0.5%-м растворе бычьего сывороточного альбумина ночь при 4°C. Мембрану промывали буфером TBS/T 15 мин и 3×5 мин, и в случае блоттинга первичных антител инкубировали со вторичными IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (антитела кролика к овечьим и козьим IgG, Jackson ImmonoResearch, США; козы антитела к IgG кролика и мыши, Sigma), затем снова промывали мембрану буфером TBS/T 15 мин, 2×5 мин, и один раз буфером TBS 5 мин. Иммунодетекцию осуществляли с помощью реагента Clarity™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad, США) и системы VersaDoc 4000 (Bio-Rad).

3.2.8. Измерение гидродинамического диаметра и концентрации липосом

Размеры липосом определяли методом динамического рассеяния света на установке Brookhaven Particle Analyzer 90+ (Brookhaven Instruments Corp., США; гелий-неоновый лазер, $\lambda=633$ нм, угол 90°).

Для липосом с пролекарством MlphDG более точные измерения проводили методом анализа траектории наночастиц (NTA)¹. Образцы липосом разбавляли очищенным от посторонних частиц буфером PBS до достижения оптимальной для измерений концентрации $1.5\text{--}2 \times 10^8$ частиц на мл. Все измерения проводились при комнатной температуре с её пассивным считыванием при одинаковых настройках камеры (Shutter: 750, Gain: 450, Lower Threshold: 780, Higher Threshold: 16380, video duration: 60 s) и обработке (NTA 2.3 build 0033, Detection Threshold: 9 Multi, min Track Length: Auto, min Expected Size: 50 nm). Для каждого образца записывали минимум 12 индивидуальных измерений с суммарным количеством траекторий около 6300–8500 для одиночных частиц. Усреднения по различным параметрам для одного образца делали с учетом длины измеренных треков. Численно-взвешенный гидродинамический диаметр и концентрация липосом в образцах были измерены на оборудовании Nanosight LM10-HSBF (Nanosight, Великобритания). Характеристики прибора: высокочувствительная EMCCD (Andor Luca) камера, мощность лазера 65 мВ, длина волны 405 нм. Все измерения проведены в соответствии со стандартом ASTM E2834-12 [96].

3.2.9. Измерение ζ -потенциала

Образцы липосом были приготовлены по методике, описанной ранее [21]. Липидные пленки гидратировали буферным раствором 10 мМ KCl, 1 мМ KH_2PO_4 , 1 мМ K_2HPO_4 (pH 7.35). После процедуры замораживания-оттаивания проводили экструзию 20 раз через поликарбонатные мембраны с размером пор 200 нм. Значения ζ -потенциала липосом были получены на приборе ZetaPALS analyzer (Brookhaven Instruments Corp., США; прибор ЦКП ИБГ РАН). Образцы липосом (1.5 мл, 1 мг/мл липидов) уравнивали в течение 1 мин, затем при температуре 25°C проводили 10 циклов измерений по 25 повторов каждый. Значения ζ -потенциала рассчитаны с использованием уравнения Смолуховского.

¹ Измерения выполнены сотрудником кафедры химической энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова Евтушенко Е.Г.

3.2.10. Флуоресцентная спектроскопия для изучения стабильности липосом

Аликвоту из образца липосом (5-7 мкл для липосом с кальцеином во внутреннем объеме и 25 мкл для образцов с FRET-парой в бислое) разбавляли предварительно нагретым (37°C) буфером PBS или сывороткой (конечное содержание 80%) до концентрации флуоресцирующего компонента (кальцеин или ТМВ-РС) соответствующей уровню поглощения менее 0.05 отн.ед., чтобы избежать эффекта внутренней фильтрации флуоресценции. Конечная концентрация липидов (10^{-4} ~ 10^{-5} М) при таком разведении соответствует ожидаемой концентрации липидов в плазме при внутривенном введении липосом [232]. Сыворотку для экспериментов получали после отстаивания пробирок с донорской кровью 1 ч при комнатной температуре и центрифугирования 2000g в течение 10 мин. Разведенные образцы инкубировали на водяной бане при 37°C от 0 до 24 ч, каждой временной точке соответствовал свой образец. Сигнал флуоресценции ТМВ-РС или высвобожденного кальцеина регистрировали с помощью флуоресцентного спектрофотометра F-4000 (Hitachi, Япония) с термостатируемой ячейкой при 37°C (Coolnics circulator СТЕ-22А, Yamato-Komatsu, Япония). Длины волн: для ТМВ-РС $\lambda_{ex} = 470$ нм, $\lambda_{em} = 505$ нм; для кальцеина $\lambda_{ex} = 485$ нм, $\lambda_{em} = 509$ нм. Для установления максимального сигнала кальцеина, соответствующего его полному высвобождению из липосом, или ТМВ-РС при нарушениях переноса FRET-пары добавляли 10 мкл 20% Triton X-100 к 200 мкл образца для разрушения бислоя. Измерения в каждой временной точке были проведены трижды, разброс данных не превышал 5%.

3.2.11. Расчеты на основании интенсивностей сигналов флуоресценции²

Изменения сигнала ТМВ-РС со временем (F_B) рассчитывали как

² Формула с учетом поправок выведена аспирантом механико-математического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Телициным Д.П.

$$FB = (I_t - I_0) / (I_{max} - I_0), \quad (1)$$

где FB – относительная интенсивность флуоресценции ТМВ-РС в течение эксперимента, I_0 – исходное значение интенсивности флуоресценции ТМВ-РС в момент разбавления образца, I_{max} – значение интенсивности флуоресценции ТМВ-РС при разрушении липидного бислоя Triton X-100 и в отсутствие переноса энергии, I_t – значение интенсивности флуоресценции в момент времени t (экспериментальные точки от 0 до 24 ч).

Формула (1) используется и для расчетов долей вытекания кальцеина из липосом в ходе эксперимента [233]–[235]. Иногда вводят поправку для учета ошибки, вносимой при пипетировании образца [236]. В ходе работы мы отбирали новую пробу как для каждой временной точки t , так и для её повторов. Для каждой пробы получали два значения – сигнал в заданный момент времени I_t и максимальный сигнал кальцеина для данной временной точки $I_{max(t)}$, соответствующий его полному высвобождению из липосом при разрушении. Мы наблюдали вариации значений максимального сигнала при разрушении липосом разных проб, и в некоторых случаях при небольших количествах высвобождения кальцеина не выполнялось неравенство $I_t > I_0$ для абсолютных значений. Для исключения вклада вариаций общего количества кальцеина от пробы к пробе использовали относительные значения сигнала в момент времени t $I_t / I_{max(t)}$. Ввели параметр Y :

$$Y = I_t / I_{max(t)} - I_0 / I_{max,0}, \quad (2)$$

где Y – изменение относительного значения интенсивности флуоресценции высвобожденного кальцеина в промежуток времени от 0 до t часов, I_0 – начальное значение интенсивности в первые минуты после разведения, $I_{max(0)}$ – значение интенсивности флуоресценции общего количества кальцеина после разрушения этого образца.

Чтобы ввести поправку (2) в формулу (1), примем, что $I_0 = a$; $I_{max} = a + b$, тогда $I_{max} - I_0 = b$ и $I_t = a + k_t \times b$, где k_t – доля высвобожденного кальцеина в момент времени t , которую и необходимо рассчитать. В таком случае:

$$Y = (k_t \times b) / (a + b), \quad (3)$$

выражая k_t получим:

$$k_t = Y \times [(a+b) / b] = Y \times [I_{max(t)} / (I_{max(t)} - I_0)], \quad (4)$$

Получаем, что доля высвобожденного кальцеина (Calcein Release) $CR = k_{(t)}$ рассчитывается по формуле:

$$CR = (I_t / I_{max(t)} - I_0 / I_{max(0)}) \times [I_{max(t)} / (I_{max(t)} - I_0)]. \quad (5)$$

Формула (5) сводится к общеизвестной (1) при выполнении условия $I_{max(t)} / I_{max(0)} \approx 1$.

3.2.12. Оценка удерживания пролекарства MlphDG в бислое

Для оценки удерживания пролекарства в бислое липосом на стадии формирования липидной пленки добавляли 1 мол. % флуоресцентно меченого липидного производного мелфалана Per-MlphDG. Аликвоту липосом разбавляли предварительно нагретым PBS или сывороткой (конечное содержание 80%), аналогично экспериментам, описанным в разделе 3.2.10. Образцы инкубировали при 37°C от 0 до 4 ч. Затем отбирали 200 мкл пробы из общего инкубируемого объема (через 0, 1.5 и 4 ч) и наносили на колонку Sepharose CL-4B (~1.1 × 19 см; $V_0 = 6$ мл), элюировали буфером PBS; собирали фракции по 200 мкл и регистрировали сигнал флуоресценции при длинах волн $\lambda_{ex} = 450$ нм, $\lambda_{em} = 520$ нм. В качестве контроля использовали 200 мкл 80% сыворотки для определения профиля элюции белков сыворотки, белок определяли по методу Лоури в каждой фракции как описано ранее [22].

3.2.13. ИК-спектроскопия липосом-белковых комплексов

Аликвоту 5 мкл (50 мг/мл) бычьего сывороточного альбумина (BSA) разбавляли 35 мкл PBS и регистрировали исходный спектр белка. Для получения спектра интактных липосом аликвоту 10 мкл (50 мМ) разбавляли 30 мкл PBS. Чтобы изучить влияние альбумина на бислой смешивали 5 мкл BSA и 10 мкл липосом, доводили объем до 40 мкл PBS и инкубировали в ячейке. Спектры липосом-белковых комплексов регистрировали через 3, 5, 10, 15 и 20 минут.

ИК-спектры регистрировали на ИК-спектрометре Фурье Tensor 27 (Bruker, Германия), оснащенным МСТ-детектором, охлаждаемым жидким азотом; термостатом (Huber, США) и системой продувки ячейки сухим воздухом (Jun-Air, Германия). Используемый метод – спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Характеристики ячейки – НПВО, BioATR-II (Bruker, Германия) с использованием кристалла однократного отражения ZnSe. Все измерения проводились при температуре 37°C и постоянной скорости продувки. На кристалл ячейки НПВО наносили аликвоту (40 мкл) образца, спектр регистрировали в интервале от 3000 до 900 см⁻¹, с разрешением 1 см⁻¹; производили 70-кратное сканирование и усреднение. Спектры анализировали с помощью программы Opus 7.0 Bruker. У полученных спектров корректировали базовую линию, находили вторую производную для деконволюции широких пиков, пиков с плечами и определения структур по характеристическому положению пиков или их плеч.

4. Результаты и их обсуждение

4.1. Липосомы с липофильным пролекарством метотрексата

Цитостатик метотрексат (МТХ, антиметаболит фолиевой кислоты) широко востребован в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит, где и на сегодня он остается «лекарством номер один». Метотрексат, являясь аналогом дигидрофолата, ингибирует дигидрофолатредуктазу и лишает клетку тетрагидрофолата — важнейшего кофактора биосинтеза пуриновых нуклеотидов, в частности, тимидилата. Эффективность лечения метотрексатом ограничивается не только его системной токсичностью, но и частым развитием клеточной устойчивости, например, при острой лимфобластической лейкемии — до 30% случаев. Ранее в лаборатории химии липидов ИБХ РАН был разработан синтез липофильного пролекарства метотрексата (МТХ) в виде его сложноэфирного диглицеридного конъюгата (МТХDG, **Рисунок 3**) [222]. Было показано, что пролекарство МТХDG в липосомальной форме преодолевает резистентность клеток лейкемии человека к метотрексату, обусловленную мутациями и недостаточной функцией белка-транспортера восстановленных фолатов (наиболее частая причина выработки резистентности к МТХ) [15].

4.1.1. Синтез пролекарства метотрексата

Для проведения запланированных исследований липосом нами было синтезировано, по описанной методике, необходимое количество диглицеридного конъюгата препарата метотрексата. Синтез включал три стадии. Сначала получали *n*-нитрофениловый эфир йодуксусной кислоты (**I**). На следующей стадии получали цезиевую соль метотрексата и алкилировали ее йодацетатом *n*-нитрофенола. В ходе реакции образуется активированное производное МТХ, преимущественно, по γ -карбоксильной группе (**II**). Изомерия производного —

свободная α -COOH группа — важна для взаимодействия с целевым ферментом МТХ дигидрофолатредуктазой. Конечный продукт МТХДГ (**III**) образуется на третьей стадии при ацилировании *rac*-1,2-диолеил-3-(3-аминопропионил)глицерина активированным эфиром производного метотрексата (**II**) в диметилсульфоксиде с триэтиламино (Рисунок 3).

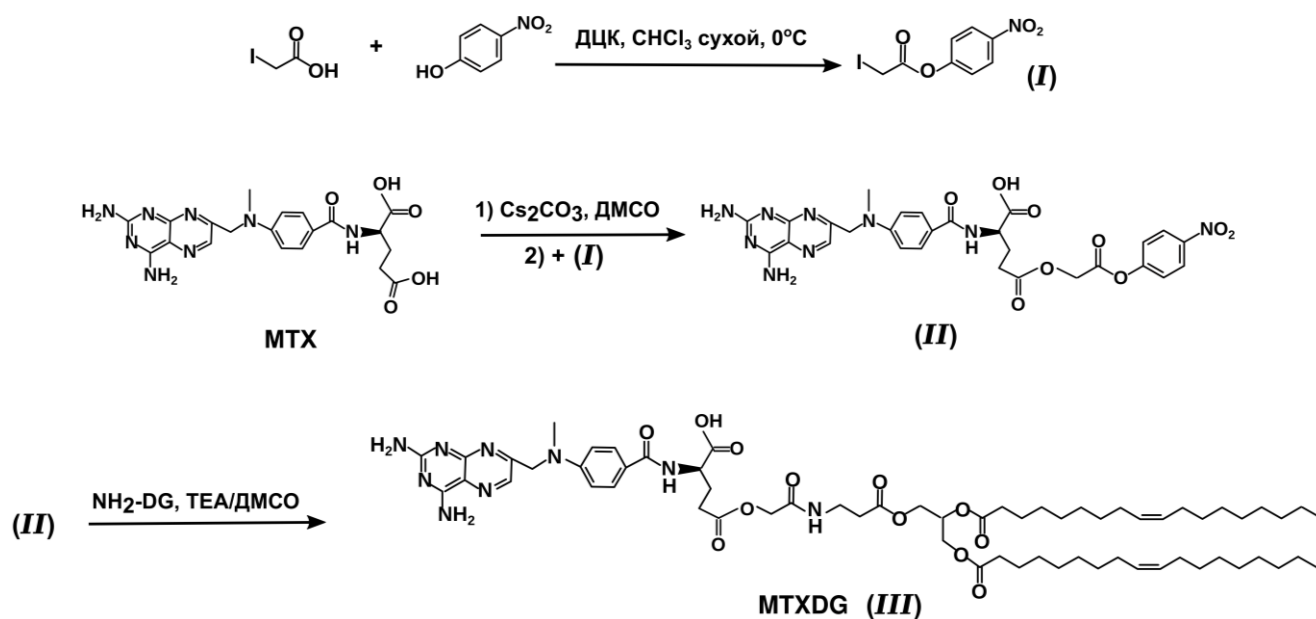


Рисунок 3. Схема синтеза пролекарства МТХДГ, где NH_2 -DG обозначение *rac*-1,2-диолеил-3-(3-аминопропионил)глицерина.

Наработанное количество конъюгата МТХДГ (~ 50 мг) использовали для получения липосом (МТХ-липосом).

4.1.2. Исследование путей активации системы комплемента МТХ-липосомами

Как уже упоминалось во Введении, ранее в тестах на гемосовместимость были получены данные об активации системы комплемента под действием МТХ-липосом [21], а также показано связывание с ними центрального компонента СК белка С3 и регуляторного фактора Н [21]. В связи с этим была поставлена задача выяснения возможных путей активации системы комплемента МТХ-липосомами базового состава ePC–МТХДГ–PI, 8 : 1 : 1 (мольн.), который был ранее

использован во всех экспериментах *in vitro* и *in vivo* [20], [21] (далее в МТХ-липосомах липид еРС обозначен как L, структура липидов приведена на **рисунке 4**).

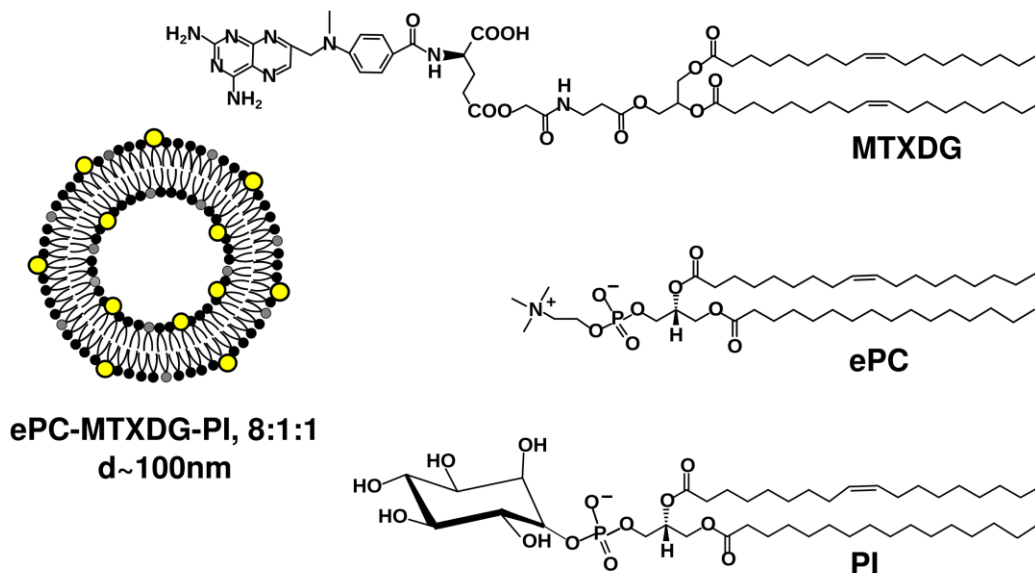


Рисунок 4. Схематичное изображение липосомы и структуры пролекарства метотрексата MTXDG, яичного фосфатидилхолина ePC и фосфатидилинозита PI.

Липосомы получали стандартным методом экструзии через 100-нм поры мембранных фильтров. По данным динамического светорассеяния, средний диаметр МТХ-липосом составлял 98 ± 2 нм, дзета потенциал -53 ± 4 мВ. Для отслеживания динамики связывания белков инкубацию липосом в 80%-ной плазме проводили в течение 5 и 30 мин – времени, достаточного для максимального развития всех взаимодействий с белками СК [237]. Еще один образец МТХ-липосом выдерживали 30 мин в плазме, в которую предварительно (за 10 мин) добавляли этиленгликольтетраацетат (EGTA, 10 мМ) и ионы Mg^{2+} (2.5 мМ), как описано в работе [237]. Хелатирующий эффект EGTA проявляется в большей степени для ионов кальция, чем для ионов магния. Наличие в системе EGTA способствует ингибированию классического пути СК за счет преимущественного связывания ионов Ca^{2+} , которые присутствуют в физиологической среде и необходимы для функционирования белка С1. EGTA не только полностью блокирует активацию СК по классическому пути, но и снижает

эффективность активации по альтернативному пути, который зависит от ионов Mg^{2+} . При добавлении ионов Mg^{2+} к самому хелатирующему агенту его влияние на альтернативный путь пренебрежимо мало [238].

Картина неспецифического окрашивания геля после электрофореза белков, связавшихся с L-MTXDG-PI, приведена на **рисунке 5А**. Во всех образцах этой серии присутствует полоса, соответствующая массе ~ 79 кДа, которая вероятнее всего представляет собой β -субъединицу компонента СК С3. Интенсивность связывания этого белка зависит от времени инкубации и присутствия в среде EGTA/ Mg^{2+} (**Рисунок 5А**). При этом степень концентрирования С3 из плазмы на липосомах данного состава высока уже в ходе 5-мин инкубации. Среди связанных белков (**Рисунок 5А**) обнаруживаются полосы, примерно соответствующие по массе фибриногену (около 55 кДа) и фрагментам α' -цепи компонента С3b (около 45 кДа и менее 30 кДа).

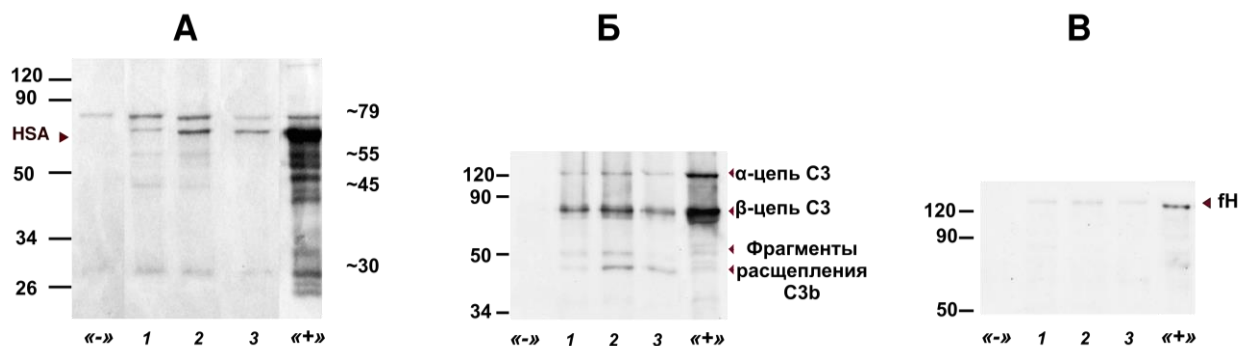


Рисунок 5. Разделение белков, ассоциированных с МТХ-липосомами (L-MTXDG-PI), с помощью электрофореза по Лэммли, окрашивание геля серебром (А), где “-” – отрицательный контроль – плазма после инкубации с PBS, гель-фильтрации и делипидизации; (1) L-MTXDG-PI, инкубированные с плазмой в течение 5 мин и (2) в течение 30 мин; (3) L-MTXDG-PI, инкубированные с плазмой в течение 30 мин после предварительной 10-мин инкубации с ингибирующей смесью EGTA/ Mg^{2+} ; “+” – положительный контроль – плазма в разведении 1/500. Все образцы были подвергнуты делипидизации.: Идентификация белков с помощью антител к компонентам системы комплемента С3 (Б) и фактору H (В).

В результате иммуноблоттинга установлено, что с течением времени липосомы L-MTXDG-PI сорбируют больше белка С3, представленного

субъединицами α (118 кДа) и β (79 кДа) (**Рисунок 5Б**, дорожки “1” и “2”). Вместе с тем, при длительной инкубации значительно увеличивается количество фрагментов этого белка (~52 кДа и ~46 кДа; первый фрагмент предположительно является α -цепью C3b). Появление фрагментов обусловлено деградацией C3b в присутствии факторов I и H (Приложение 2), последний из которых также обнаруживается в комплексах с липосомами (**Рисунок 5В**). В то же время, концентрирование регуляторного fH из плазмы в данном случае выражено слабо. Это уменьшает вероятность ингибирования амплификации активации СК по альтернативному пути под действием фактора H, сорбированного на поверхности липосом L-MTXDG-PI. Усиление интенсивности полосы, соответствующей массе ~46 кДа (**Рисунок 5Б**, дорожка “2”), свидетельствует о протекании более полного расщепления C3b в соответствии со схемой в приложении 2 и накоплении фрагментов деградации со сходными весами: фрагмент субъединицы α' 41.5-43 кДа; C3gd 35-40 кДа, α_2 39.5-40 кДа, в соответствии с данными различных источников [110], [237]. Добавление EGTA/Mg²⁺, где EGTA ингибирует классический путь активации комплемента, значительно снижает количество ассоциированного с липосомами белка C3 и препятствует его деградации (**Рисунок 5Б**, дорожка “3”).

Иммуноблоттинг также показал рост связывания иммуноглобулинов класса G с липосомами L-MTXDG-PI с течением времени и ингибирование этого процесса в присутствии смеси EGTA/Mg²⁺ (полоса ~ 63 кДа, **Рисунок 6А**). Такой результат подразумевает наличие на липосомах определенных функциональных групп или сайтов, связывание с которыми IgG зависит от присутствия ионов кальция в среде. Распознавание IgG на липосомах первым компонентом СК C1 способствует активации комплемента по классическому пути. Также IgG может взаимодействовать непосредственно с C3 и его фрагментами, при этом активация СК происходит по альтернативному пути, а не вызвана образованием иммунных комплексов с липосомами [98]. Связывание иммуноглобулинов класса M с липосомами L-MTXDG-PI при увеличении времени инкубации также

увеличивается, однако добавление смеси EGTA/Mg²⁺ не влияет на этот процесс (**Рисунок 6Б**). Следовательно, образование таких иммунных комплексов не должно привести к активации СК по классическому пути, для реализации которого необходимы ионы Ca²⁺. Помимо участия в запуске каскада СК ассоциация с IgM может способствовать ускоренному выведению липосом из кровотока макрофагами печени [104].

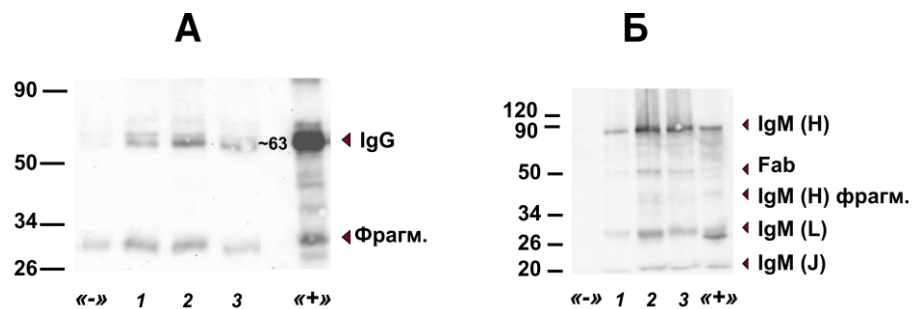


Рисунок 6. Идентификация белков, ассоциированных с МТХ-липосомами, с помощью антител **А:** к иммуноглобулинам класса G и **Б:** к иммуноглобулинам класса M. **А:** Полоса ~29 кДа может быть отнесена к легкой цепи IgG, Fv-фрагментам или восстановленному Fab-фрагменту. **Б:** Кроме тяжелой (H ~83 кДа), легкой (L ~31 кДа) и J (~20 кДа) цепей IgM обнаруживаются полосы Fab-фрагмента (~52 кДа) и фрагментов H-цепи (~40, 44 и 48 кДа, по данным [239]). Обозначения аналогичны рис. 5.

Механизмы активации СК липосомами различного состава изучены недостаточно. В ранних работах показано, что отрицательно заряженные липосомы активируют СК по классическому пути и посредством прямых взаимодействий компонента C1q с анионными липидами; напротив, положительно заряженные липосомы активируют СК по альтернативному пути (обзор [240]). Реактивность отрицательно заряженных липосом L-MTXDG-PI вероятнее всего связана с искажением структуры их поверхности объемистыми остатками метотрексата, а также наличием в этих остатках пары экзоциклических ароматических амино-функций и свободной α-COOH группы. Амино (и гидроксид) группы, расположенные на поверхности особым образом относительно друг друга, могут вызывать активацию СК путем нуклеофильной атаки на внутреннюю

тиоэфирную связь фрагмента С3b [241], что приводит к ускорению спонтанного гидролиза компонента С3 и активации альтернативного пути СК [242]. В целом, наши результаты свидетельствуют о включении как альтернативного, так и классического пути активации СК под действием липосом L–MTXDG–PI.

4.1.3. Исследование влияния экранирующих компонентов в мембране MTX-липосом на взаимодействие с лейкоцитами

Поскольку опсонизация наноносителя белками СК способствует его распознаванию рецепторами иммунокомпетентных клеток, следующей задачей было изучение влияния амфифильных экранирующих молекул в мембране MTX-липосом на взаимодействие с лейкоцитами. В качестве таких молекул были выбраны фосфатидилинозит (PI), ганглиозид GM₁ и конъюгат N-карбоксиметилированного олигоглицина с фосфатидилэтаноламином (CMG-PE) (Рисунок 7).

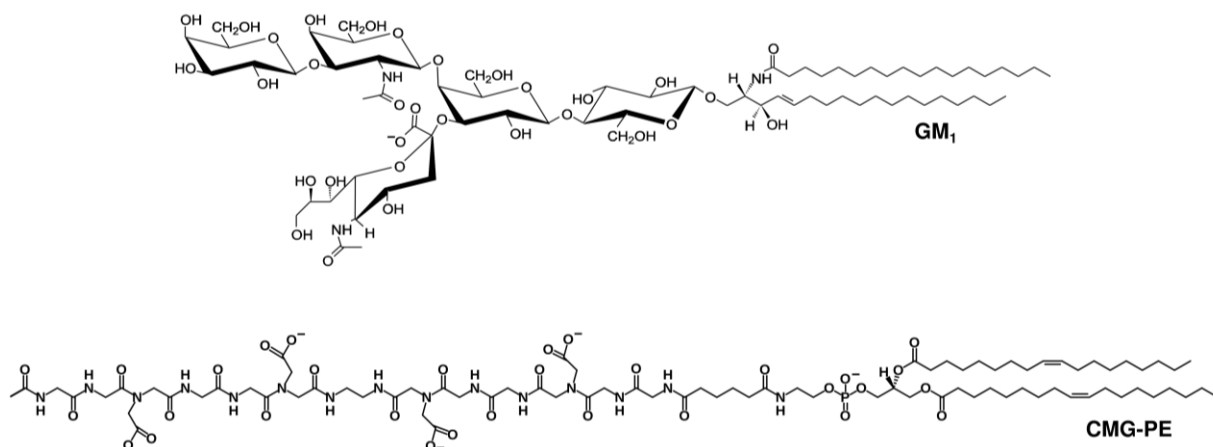


Рисунок 7. Структуры ганглиозида GM₁ и пептидолипида CMG-PE.

По данным авторов [243], включение фосфатидилинозита (PI) в бислои уменьшало захват липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы. Такой эффект можно объяснить отрицательным зарядом фосфолипида с относительно крупной головной группой, а также стерическими препятствиями, которые создают высокогидратированные остатки мио-инозита на поверхности липосом [244]. Ганглиозид GM₁ в липосомах увеличивал время циркуляции в кровотоке

еще больше, чем PI, благодаря объемистому и жесткому отрицательно заряженному остатку пентасахарида [245]. Пептидолипид SMG-PE ранее был опробован в виде конъюгата с различными пептидами для скрининга аффинных белков плазмы, при этом не наблюдалось связывания с нецелевыми белками, то есть фрагмент-спейсер SMG был «инертен» [246]. Мы предположили, что такой протяженный отрицательно заряженный фрагмент способен экранировать поверхность липосом.

Взаимодействие липосом с субпопуляциями лейкоцитов цельной крови исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Применение цитометрии для исследования взаимодействий липосом с субпопуляциями лейкоцитов крови описано лишь в нескольких публикациях [168], [247]-[249], причем в работах [168] и [249] липосомы инкубировали с выделенными нейтрофилами или мононуклеарами, соответственно, а не с цельной кровью. Авторы [247] инкубировали кровь с «твердофазными» пегелированными липосомами 3 ч, другие авторы [248] – 5 ч, затем лизировали эритроциты в гипотоническом буфере и проводили FACS-анализ, детектируя суммарную флуоресценцию связанных и поглощенных клетками липосом. В нашем случае протокол инкубаций был изменен. Для исключения из регистрации адсорбированных, но не фагоцитированных клетками липосом, был использован тушитель флуоресценции – краситель фиолетовый кристаллический [250]. Критическими стадиями дизайна эксперимента стали подбор времени инкубации и условий для лизиса эритроцитов при сохранении целостности нейтрофилов. С учетом времени, необходимого для подготовки пробы перед цитометрией (после инкубаций липосом с кровью), и времени хранения цельной крови не более 8 ч в одном эксперименте можно было проанализировать не более трех вариантов липосом, каждый в двух повторах. На **рисунке 8** представлены репрезентативные гистограммы FACS-анализа поглощения субпопуляциями лейкоцитов крови липосом различных составов, меченных флуоресцентным липидным зондом TMB-PC (1,3,5,7-тетраметил-

BODIPY-меченый фосфатидилхолин). Образцы донорской крови были получены с интервалом в один день, и количества клеток в субпопуляциях слегка варьируют.

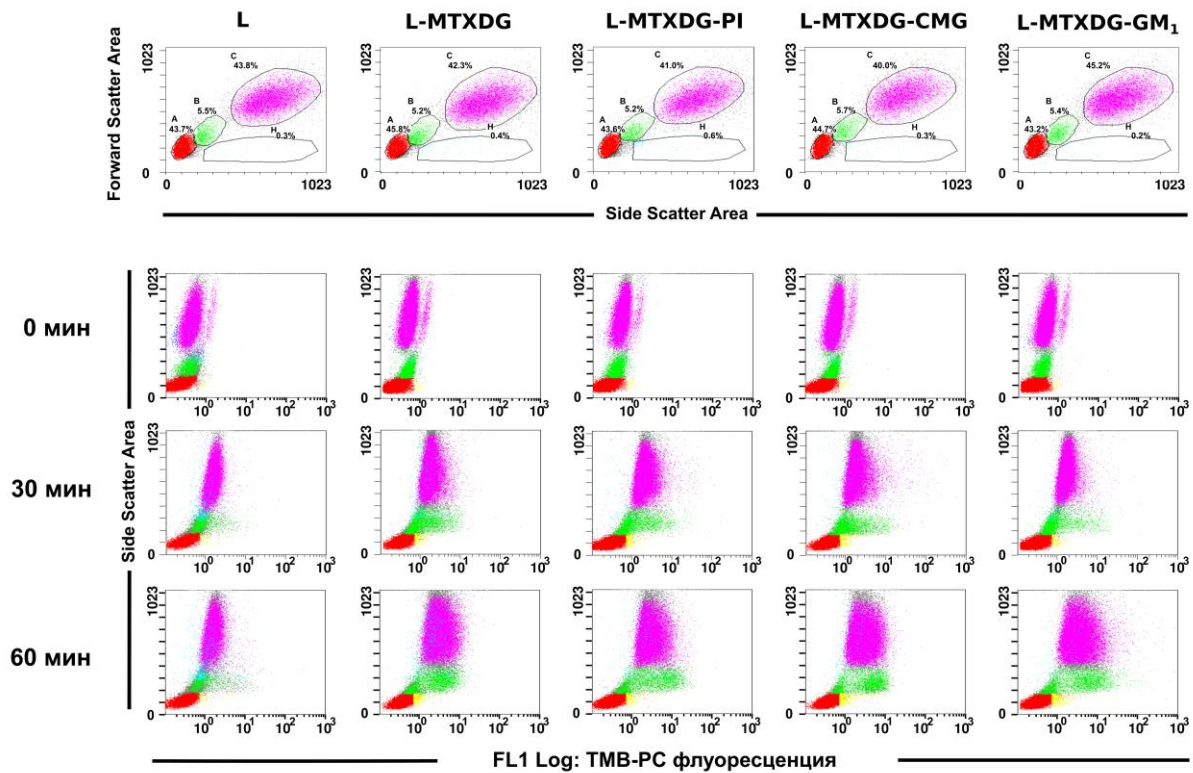


Рисунок 8. Гистограммы FACS-анализа образцов крови после инкубации с липосомами и лизиса эритроцитов. Верхняя панель: распределение клеток периферической крови в образцах без липосом, FS – малоугловое светорассеяние, SS – светорассеяние под углом 90° , A – лимфоциты, B – моноциты, C – нейтрофилы. Панели 0, 30, 60 min: флуоресценция фагоцитированных липосом «гейтированная» по субпопуляциям лейкоцитов после инкубаций 0, 30, 60 мин (добавлен тушитель флуоресценции адсорбированных липосом). TMB-PC липосомы следующих составов: только из ePC (образец L) и MTX-липосомы ePC–MTXDG, 9:1 (образец L–MTXDG), ePC–MTXDG–PI, 8:1:1 (образец L–MTXDG–PI), ePC–MTXDG–CMG–PE, 8:1:1 (образец L–MTXDG–CMG), ePC–MTXDG–GM₁, 8:1:1 (образец L–MTXDG–GM₁).

Очевидно, что лимфоциты не аккумулируют липосомы, что соответствует отсутствию функции фагоцитов у этих клеток и согласуется с современными представлениями о том, что основное количество наночастиц в кровотоке фагоцитируется моноцитами и нейтрофилами [247], [251]. На рисунке 9

результаты FACS-анализа представлены в виде кинетики роста процента клеток, поглотивших липосомы в течение 1 ч инкубации.

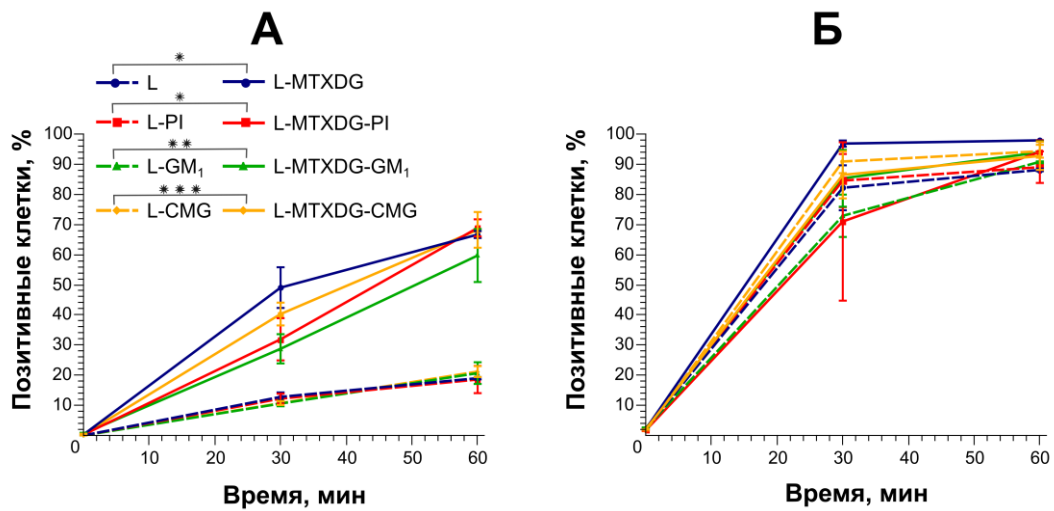


Рисунок 9. Кинетика поглощения липосом моноцитами (А) и нейтрофилами (Б) цельной крови человека *ex vivo*. Приведены средние значения $\pm SE$ двух независимых экспериментов, каждый в двух повторах; значения * $p < 0.04$, ** $p < 0.02$, *** $p = 0.002$ приведены для данных, полученных после 30 мин инкубации.

С учетом разброса данных в повторах примерно 10 %, можно сделать вывод, что МТХ-липосомы быстрее накапливаются в моноцитах, чем липосомы без пролекарства, вне зависимости от наличия тех или иных защитных амфифильных молекул. То есть как таковые молекулы МТХДГ в мембране способствуют ускорению поглощения липосом популяцией моноцитов. Введение в мембрану пептидолипида лишь незначительно замедляет фагоцитоз МТХ-липосом моноцитами. В случае же ганглиозида GM₁ и PI липосомы медленнее накапливаются в моноцитах по сравнению с МТХ-липосомами без амфифила (**Рисунок 9**). Но к 60 мин все различия между образцами МТХ-липосом нивелируются, в их фагоцитозе участвуют примерно 60-70 % моноцитов и около 98 % нейтрофилов. При этом интенсивность поглощения липосом нейтрофилами (средняя интенсивность флуоресценции, X-mean) значительно ниже, чем моноцитами (**Рисунок 10**): с учетом примерно в 7 раз большей численности популяции нейтрофилов каждая клетка поглощает примерно в 15 раз меньше липосом, чем моноцит. Можно связать низкий уровень фагоцитоза и быстрый

выход на насыщение липосомами в случае нейтрофилов с тем, что ведущая роль этих клеток состоит в защите от бактериальных, но не вирусных инфекций [162], а липосомы по размерам сравнимы с вирусными частицами.

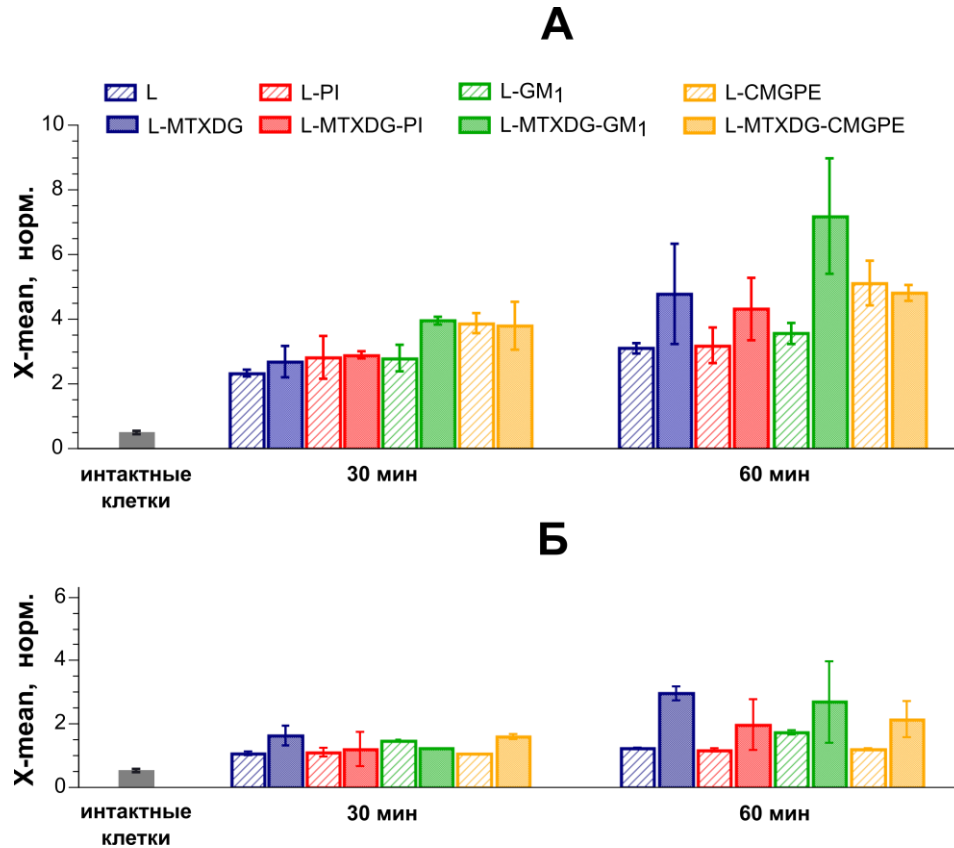


Рисунок 10. Средняя интенсивность флуоресценции ($X\text{-mean}$) поглощенных липосом для позитивных популяций моноцитов (**А**) и нейтрофилов (**Б**). Приведены средние значения $\pm SE$ двух независимых экспериментов, каждый в двух повторях.

Эндоцитоз липосом фагоцитами крови опосредуют рецепторы белков плазмы, ассоциированных с липосомами. Основными рецепторами для захвата липосом считаются рецепторы к константным областям иммуноглобулинов класса G (FcγR I-III) и рецепторы компонентов системы комплемента C3b и iC3b (CR1 и CR3) [164]. В наших работах [22] было установлено, что компонент C3b на поверхности липосом без MTXDG не детектировался при иммуноблоттинге, то есть его количество было ничтожно мало, в то время как для L-MTXDG-PI наблюдались полосы его фрагментов. Эти данные и различный уровень поглощения клетками МТХ-липосом и липосом без пролекарства (при инкубации 60 мин, **рисунок 10**, кроме CMG-липосом) согласуются с данными литературы

[164] о поглощении липосом моноцитами через узнавание опсоинов на поверхности липидного бислоя.

Анализ средней интенсивности флуоресценции поглощенных липосом для позитивных популяций моноцитов и нейтрофилов (**Рисунок 10**) позволяет также сделать следующие выводы. Наличие CMG-PE (независимо от присутствия пролекарства) способствовало интернализации моноцитами. Для нейтрофилов, в целом, имеется тенденция более активного фагоцитоза липосом с пролекарством клетками, независимо от наличия амфифила в бислое.

Неожиданный эффект обнаружили МТХ-липосомы с ганглиозидом GM₁. Несмотря на то, что через 30 мин большее число моноцитов поглощает МТХ-липосомы без амфифилов, чем МТХ-липосомы с GM₁ (**Рисунок 9**), средняя интенсивность флуоресценции моноцитов достоверно больше для липосом L-MTXDG-GM₁ по сравнению с липосомами без ганглиозида L-MTXDG как через 30, так и через 60 мин инкубации (**Рисунок 10**). При том, что само по себе присутствие GM₁ не приводило к более интенсивному фагоцитозу липосом моноцитами, при наличии в бислое сочетания пролекарства и ганглиозида моноциты поглощали этих липосом больше, чем любых других. Можно предположить, что в данном случае рецепторы моноцитов распознают молекулы ганглиозида GM₁ либо белков плазмы, ассоциированных с данными липосомами.

Мы решили сравнить МТХ-липосомы, содержащие различные экранирующие молекулы, на предмет связывания в плазме компонента С3 и продуктов его расщепления. Для этого препараты липосом инкубировали в 80%-ой плазме крови 15 мин (так же, как при изучении гемосовместимости, когда было показано влияние МТХ-липосом на СК [21]). Затем гель-хроматографией на сефарозе выделяли фракции, содержащие липосомы, и определяли в них суммарное количество белка. В качестве контроля эффективности отделения липосом-белковых комплексов от основного количества не связавшихся белков плазмы использовали образцы плазмы, проинкубированные с PBS. В результате

иммуноблоттинга с антителами к белку С3 (**Рисунок 11А**) установлено, что МТХ-липосомы с ганглиозидом GM_1 и пептидолипидом $CMG-PE$ вызывают значительную фрагментацию этого компонента СК с образованием продуктов расщепления $C3b$. В случае липосом $L-MTXDG-PI$ и $L-MTXDG$ количество связанного С3 и продуктов его расщепления заметно меньше. Сопоставление с данными цитометрии на 30 мин (**Рисунок 10А**) показывает, что именно липосомы $L-MTXDG-GM_1$ и CMG -липосомы проявляют примерно одинаковую и наибольшую из всех липосом интенсивность поглощения моноцитами. Причем в случае CMG -липосом усиления фагоцитоза моноцитами за счет присутствия в мембране $MTXDG$ не наблюдается, в отличие от GM_1 -липосом (**Рисунок 10А**). Очевидно, именно остаток $CMG-PE$ определяет взаимодействие с белками (и последующее взаимодействие с моноцитами), поскольку в силу своей структуры он экспонирован над поверхностью липосом в большей степени, чем остаток МТХ.

Иммуноблоттинг с антителами к IgG (**Рисунок 11Б**) не выявил различий между вариантами липосом, причем уровень связывания иммуноглобулинов оказался значительно ниже, чем в случае компонента С3.

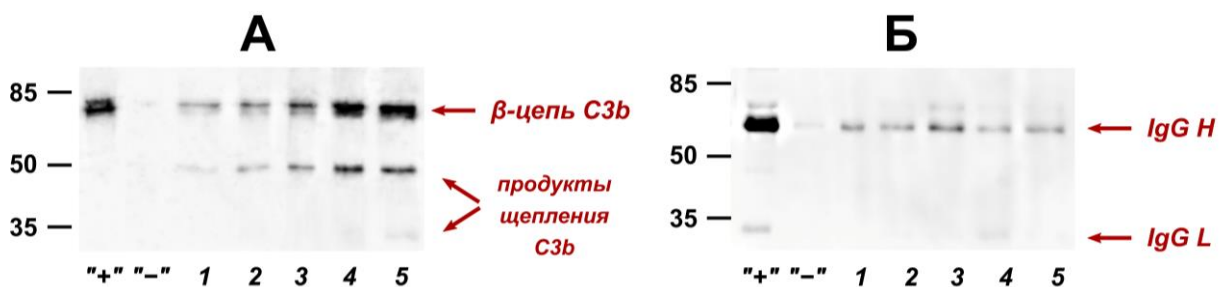


Рисунок 11. Идентификация белков, ассоциированных с липосомами, с помощью иммуноблоттинга с использованием антител к компоненту системы комплемента С3 (**А**), к иммуноглобулинам класса G (**Б**): "+" — положительный контроль, плазма в разведении 1/500; "-" — отрицательный контроль, плазма после инкубации с PBS, гель-фильтрации и делипидизации; 1-5 — образцы липосом L (1), $L-MTXDG$ (2), $L-MTXDG-PI$ (3), $L-MTXDG-GM_1$ (4), $L-MTXDG-CMG-PE$ (5) после 15-мин инкубации с плазмой крови человека, выделения липосом-белковых комплексов и делипидизации.

Наши результаты показывают, что наличие в мембране липосом пролекарства метотрексата, в целом, усиливает их фагоцитоз как моноцитами, так и нейтрофилами. Введение фосфатидилинозита в МТХ-липосомы практически не влияет на их поглощение, а пептидолипид SMG-PE скорее способствует накоплению липосом моноцитами. Ганглиозид GM₁ оказывает двойственный эффект: предположительно, он экранирует МТХ-липосомы от фагоцитоза одной популяцией моноцитов (отсюда значительно меньшая доля позитивных моноцитов после 30 мин инкубации), но увеличивает эффективность поглощения моноцитами другой популяции, вероятно, с повышенной экспрессией рецепторов к фрагментам C3b, что выражается в высокой средней интенсивности флуоресценции моноцитов.

Лимфоциты – главные клетки иммунной системы, обеспечивающие гуморальный и клеточный иммунитет – по нашим данным составили примерно 40 % всей популяции лейкоцитов крови (**Рисунок 8**). Однако за 1 час инкубации с кровью мы не наблюдали поглощения липосом лимфоцитами. Более того, по данным авторов [247], через 3 ч инкубации лимфоциты также не аккумулировали липосомы (другого состава), причем в цитируемой работе учитывались не только интернализированные, но и адсорбированные/связанные на поверхности клеток липосомы. Очевидно, неактивированные лимфоциты крови здоровых доноров инертны по отношению к липосомам.

Таким образом, нами показано, что введение липофильного пролекарства метотрексата в липидный бислой липосом стимулирует их фагоцитоз моноцитами независимо от наличия исследованных экранирующих молекул в мембране. Очевидная причина такого явления – экспонирование остатков метотрексата на поверхности липосом. Мы не исключаем вероятности того, что включение в мембрану PEG-липида могло бы более эффективно экранировать МТХ-липосомы от опсонизации. Однако в связи с данными об иммуногенности (см. Введение) мы стремились не использовать пегилирование.

4.2. Липосомы с липофильным пролекарством мелфалана

Мелфалан (M₁ph, L-сарколизин) — важнейший в химиотерапии злокачественных новообразований цитотоксический агент алкилирующего типа, действующий независимо от стадии клеточного цикла и обладающий широким спектром противоопухолевой активности. Цитотоксический эффект M₁ph обусловлен взаимодействием образующегося интермедиата – катиона азиридиния – с ДНК. Образование сшивки между цепями ДНК или между цепью ДНК и белком приводит к ингибированию репликации и транскрипции. Из-за гидролитической нестабильности при физиологических значениях рН и быстрого выведения из кровотока, M₁ph вводится в больших дозах, что вызывает тяжелые побочные эффекты. Липосомальная форма способна улучшить фармакологические свойства мелфалана. Однако инкапсулирование его как такового в наноразмерные липосомы неэффективно по причине малой растворимости в воде и относительно быстрого гидролиза в нейтральной среде. Включение мелфалана в мембрану липосом в виде пролекарства M₁phDG (**Рисунок 12**) позволяет преодолеть указанные ограничения.

4.2.1. Характеристика липосом

Для изучения влияния экранирующих компонентов в мембране липосом с пролекарством мелфалана (M₁ph-липосом) на стабильность липидного бислоя в условиях контакта с белками плазмы крови нами был приготовлен набор липосом (**Таблица 1**) на основе яичного фосфатидилхолина (ePC). Каждый вариант липосом содержал 2 или 10 мольн. % защитных молекул — фосфатидилинозита, ганглиозид GM₁ или пептидолипида SMG-PE.

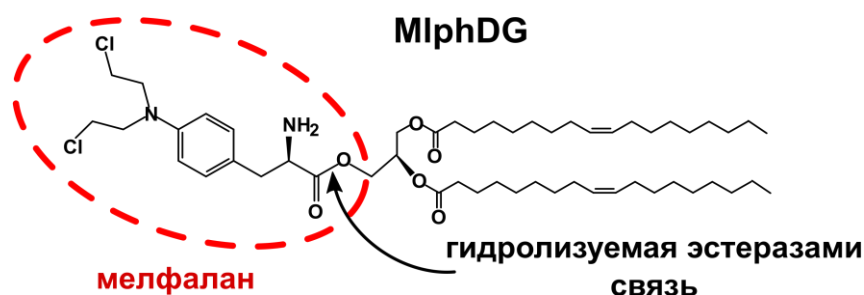


Рисунок 12. Структура липофильного конъюгата мелфалана (MlphDG).

Состав образцов липосом, их размеры (определены методом анализа траекторий наночастиц, NTA) и дзета-потенциалы приведены в таблице 1. С помощью метода NTA³ также определяли общую концентрацию липосом в образцах, полученные данные хорошо согласовывались с теоретическими (данные не приведены).

Таблица 1. Состав и физико-химические характеристики липосом, измеренные методом анализа траекторий наночастиц (NTA).

Образец	Состав бислоя (мольн.)	Диаметр, нм*	Дзета-потенциал, мВ**
L-MlphDG	ePC-MlphDG, 9:1	90 ± 2	+18
L-MlphDG-PI	ePC-MlphDG-PI, 8:1:1	90 ± 2	-25
L-MlphDG-GM ₁ (2%)	ePC-MlphDG-GM ₁ , 9:1:0.2	88 ± 2	+5
L-MlphDG-GM ₁ (10%)	ePC-MlphDG-GM ₁ , 8:1:1	89 ± 2	-30
L-MlphDG-CMG-PE (2%)	ePC-MlphDG-CMG-PE, 9:1:0.2	86 ± 2	-31
L-MlphDG-CMG-PE (10%)	ePC-MlphDG-CMG-PE, 8:1:1	87 ± 1	-66

*Приведены доверительные интервалы (p = 95%)

**Измерены с помощью фотонной корреляционной спектроскопии; данные для 200-нм липосом

Введение различных амфифильных молекул в бислой значительно повлияло на дзета-потенциал. Для липосом L-MlphDG положительное значение дзета-потенциала обусловлено протонированием первичной аминогруппы. Введение в бислой 2% GM₁ лишь частично компенсировало положительный заряд, увеличение содержания ганглиозида до 10%, как и введение 10% PI или CMG-PE

³ Измерения и расчеты с использованием метода NTA выполнены м.н.с. кафедры химической энзимологии МГУ им. М.В. Ломоносова Евтушенко Е.Г.

снижало значение дзета-потенциала до отрицательных величин. Конъюгат SMG-PE приводил к наиболее значимому снижению до -31 мВ уже при содержании 2 мольн. % благодаря наличию 4-х карбоксильных групп в молекуле.

4.2.2. Исследование влияния экранирующих компонентов в мембране на стабильность Mph-липосом в сыворотке крови

Для изучения состояния липосом при взаимодействии с белками сыворотки использовали несколько флуоресцентных методов и ИК-спектроскопию с преобразованием Фурье.

4.2.2.1. Вытекание кальцеина из липосом

Стабильность липосом с точки зрения сохранения ими замкнутой мембраны и возможности/невозможности высвобождения содержимого внутреннего водного объема изучали с использованием метода разгорания флуоресценции красителя кальцеина, инкапсулированного во внутренний объем липосом в самозатушенной концентрации. При вытекании во внешнюю среду детектируется флуоресценция свободного красителя. Были получены образцы липосом, перечисленные в таблице 1 и содержащие 80 мМ-раствор кальцеина в PBS во внутреннем водном объеме. Каждый образец инкубировали в буфере и в 80% сыворотке крови человека при 37°C .

На **рисунке 13** приведены кривые изменения флуоресценции высвобождающегося из внутреннего объема кальцеина. В отсутствие стабилизирующих компонентов через жидкофазный бислой L-MphDG (**Рисунок 13А**) происходило медленное постоянное высвобождение кальцеина. Доля высвободившегося кальцеина (CR) за 24 ч инкубации в буфере составила 0.08 единиц (8%). Кальцеин может проходить через водные поры и каналы жидкофазной мембраны без ее разрушения, что было показано в работе [235]. При инкубации в сыворотке на бислой оказывает действие формирующаяся белковая

корона, за счет возможной активности ферментов или внедрении её компонентов в бислои. Наиболее резкий подъем кривой разгорания флуоресценции кальцеина $CR=f(t)$ (calcein release) для всех образцов наблюдали в первые минуты инкубации, когда образуется корона и система ещё не пришла в равновесие. Затем высвобождение кальцеина замедлялось и после 24 ч инкубации в сыворотке доля кальцеина вне липосом составила 0.19 единиц.

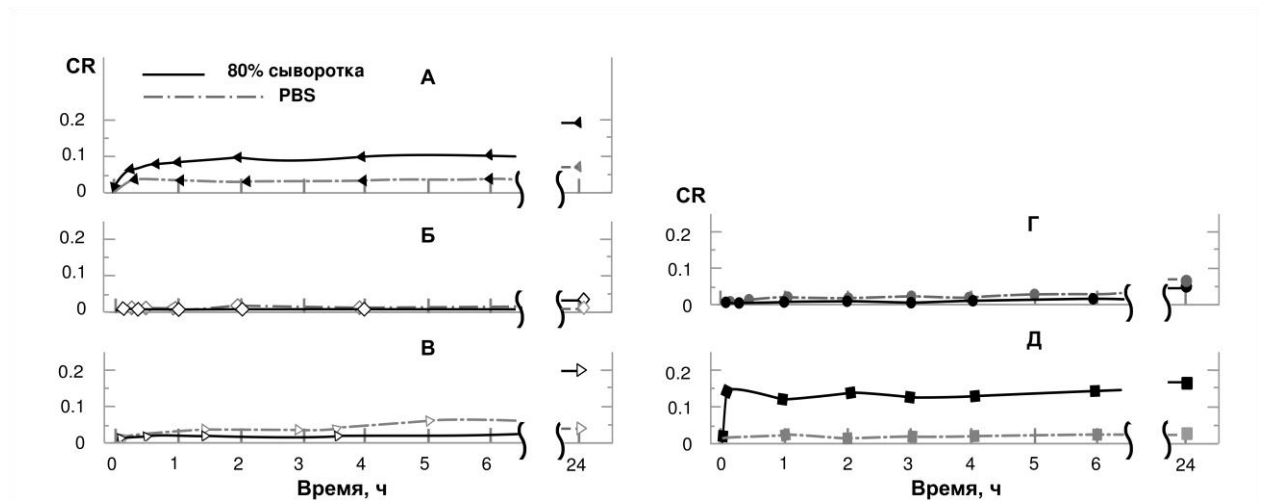


Рисунок 13. Уровень высвобождения кальцеина из липосом в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир), где CR – доля свободного кальцеина в растворе. **А:** образец L - $MlphDG$, **Б:** образец $DSPC$ - $MlphDG$, **В:** образец L - $MlphDG$ - PI , **Г:** образец L - $MlphDG$ - GM_1 (2%), **Д:** образец L - $MlphDG$ - CMG - PE (2%).

При замене матрицы из ePC на $DSPC$, образующий бислой с плотно упакованными стеариоильными цепями (температура фазового перехода T_m $55^\circ C$) и, как следствие, затрудненной диффузией кальцеина, за 24 ч инкубации как в буфере, так и в сыворотке мы наблюдали пренебрежимо малое значение CR около 0.03 единиц (**Рисунок 13Б**). Данное наблюдение также согласуется с обсуждаемым в работе [235] механизмом диффузии кальцеина через углеводородную часть бислоя.

Введение 10% фосфатидилинозита в состав бислоя снижало уровень высвобождения кальцеина в первые 4 ч при инкубации в сыворотке (**Рисунок 13В**), но общий уровень кальцеина вне липосом к 24 ч достигал значений образца

L-MlphDG. Уровень высвобождения в буфере был очень близок к образцу L-MlphDG в ходе всей инкубации.

Замена PI на 2% ганглиозида GM₁ приводила к наиболее значительному снижению уровня высвобождения кальцеина. За сутки инкубации как в буфере, так и в сыворотке значение CR составило около 0.05 единиц (**Рисунок 13Г**). Такое количество жесткого пентасахарида на поверхности оказалось оптимальным для защиты бислоя. Повышения содержания GM₁ до 10 % приводило к резкому выбросу кальцеина из липосом в первые минуты инкубации (**Рисунок 14А**).

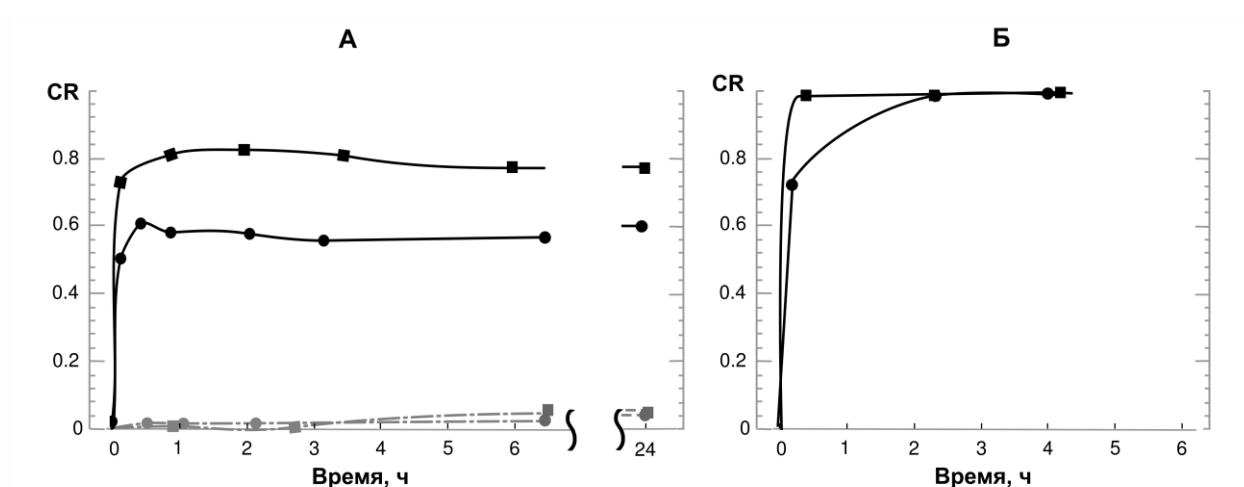


Рисунок 14. Уровень высвобождения кальцеина из липосом в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир), где CR – доля свободного кальцеина в растворе. **А:** образцы L-MlphDG-GM₁ (10%) - круглый маркер и L-MlphDG-CMG-PE (10%) - квадратный маркер, **Б:** образец DSPC-MlphDG-GM₁ (10%) - круглый маркер и DSPC-MlphDG-CMG-PE (10%) - квадратный маркер.

Мы предполагаем, что взаимодействие белков сыворотки с жестким и отрицательно заряженным каркасом остатков GM₁ приводит к локальным колебаниям липидов, разрыхлению бислоя и образованию пор и каналов для выхода кальцеина. Подобный эффект был еще более выражен для состава липосом с 10 % CMG-PE (**Рисунок 14А**). Эти липосомы характеризуются наиболее отрицательным значением дзета-потенциала (-66 мВ), которое создается за счет карбокси-групп олигоглицина. Взаимодействие белков с остатками CMG в начальный момент времени инкубации оказывает сильное влияние на бислой.

Можно предположить, что это обусловлено электростатическим отталкиванием между остатками CMG и белками сыворотки, которые стремятся взаимодействовать с незанятой пептидолипидом поверхностью липосом, что вызывает латеральную диффузию липидов и, как следствие таких перестроек и флуктуаций, образование «микротрещин» за счет уширения так называемых водных каналов, предсуществующих в липидном бислое. Для образца с 2 % CMG-PE (**Рисунок 13Д**) наблюдался небольшой, но резкий выброс кальцеина в самом начале инкубации. Для остальных трех систем (10% GM1, 10% CMG-PE, 2% CMG-PE) выброс кальцеина происходил до достижения некоторого равновесия системы и белковой короны — значение CR почти не изменялось после 15 минут инкубации вплоть до 24 ч.

Чтобы проверить гипотезу о локальных порах-каналах в липосомах, открывающихся и закрывающихся из-за колебаний, передающихся от взаимодействия белков с жесткими и отрицательно заряженными структурами над поверхностью бислоя, мы готовили образцы липосом с заменой матричного ePC на дистеароилфосфатидилхолин (DSPC-MlphDG-GM₁, DSPC-MlphDG-CMG; по 10% защитных молекул). В отличие от абсолютно стабильных DSPC-MlphDG, образцы с включением 10% GM₁ или CMG-PE разрушались в сыворотке, высвобождая весь кальцеин практически в начальный момент инкубации (**Рисунок 14Б**). Менее отрицательно заряженный вариант липосом с ганглиозидом высвобождал кальцеин медленнее, хотя значение CR и достигало 1 за 2 часа. Жесткий бислой, как оказалось, не мог сохранить целостность и не успевал перестроиться и «запаять» поры и трещины, образуемые из-за взаимодействия белков с крупными отрицательно заряженными структурами на поверхности липосом. Однако остался открытым вопрос, продолжают ли жидкофазные липосомы сохранять исходную везикулярную структуру благодаря эластичности своих мембран, или они разбиваются на мицеллярные комплексы с белками, которые удерживают часть самозатушенного кальцеина?

4.2.2.2. Изучение целостности бислоя с использованием FRET-пары фосфолипидных зондов

Ранее в лаборатории химии липидов была разработана донорно-акцепторная пара флуоресцентных производных фосфатидилхолина с очень близкими структурами флуорофоров. Донор – тетраметил-BODIPY производное (ТМВ-РС), акцептор – бициклогексил-BODIPY производное (ВСНВ-РС), структуры которых приведены на **рисунке 15**. Данные липидные флуоресцентные зонды позволяют изучать изменения в бислое, например, при взаимодействии с белками, основываясь на явлении Фёрстеровского переноса энергии [225], [252].

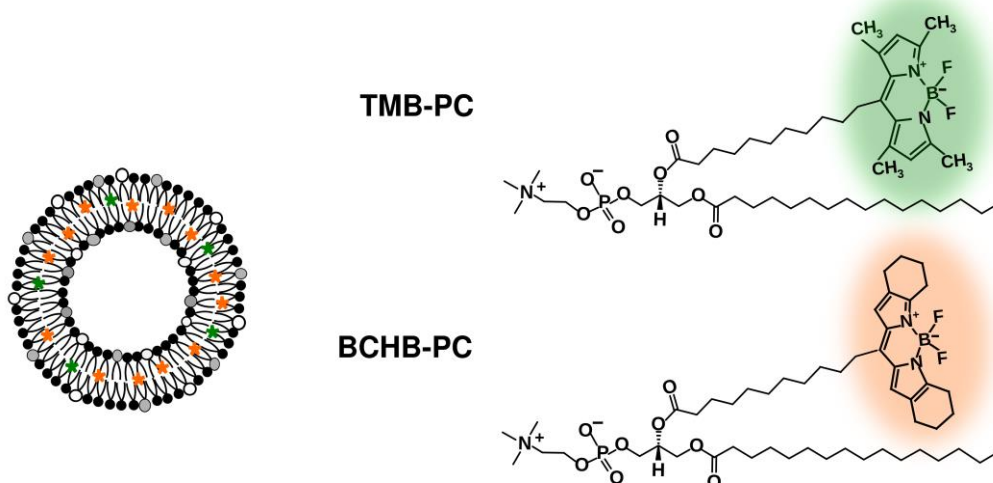


Рисунок 15. Структура FRET-пары зондов и схематичное изображение флуоресцентномеченой липосомы

В наших экспериментах бислой липосом содержал 0.5 мольн. % ТМВ-РС и 1.5 мольн. % ВСНВ-РС. Небольшое общее содержание зондов не вызывает искажений в мембране, а упомянутое соотношение достаточно для выполнения переноса энергии на акцептор ВСНВ-РС и минимизации собственного сигнала донора ТМВ-РС. Эффективность переноса энергии при данном диполь-дипольном взаимодействии зависит от расстояния между донором и акцептором. Флуоресценция донора увеличивается при отдалении от акцептора на расстояние, превышающее радиус Фёрстера, а при удалении более чем на 2 радиуса Фёрстера

перенос маловероятен. Для выбранной пары зондов радиус Фёрстера составляет 52\AA [225].

Зонды включали в липосомы с пролекарством мелфалана, содержащие по 10 % PI, GM₁ или CMG-PE. При инкубации в PBS липосом с GM₁ или CMG-PE разгорания флуоресценции донора практически не наблюдалось в течение 5 ч. К 24 ч инкубации для всех образцов липосом доля сигнала флуоресценции донора после нормализации была в пределах значения 0.1, если считать что при полном расхождении меток (после разрушения липосом Тритоном X-100) и прекращении переноса энергии значение достигает 1 (Рисунок 16).

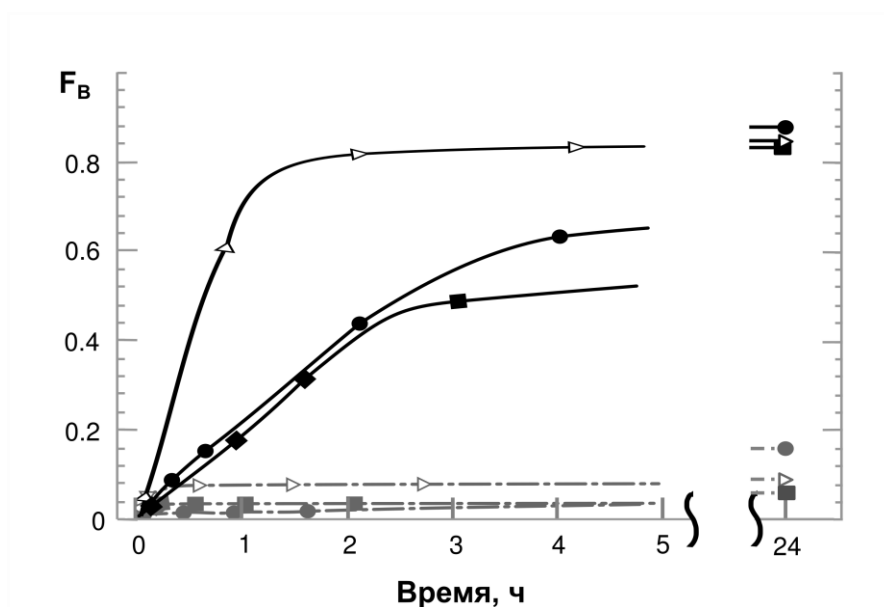


Рисунок 16. Разгорание флуоресценции донора при инкубации липосом в сыворотке (сплошная кривая) и буфере (пунктир), где $F_B=1$ — максимальное значение интенсивности флуоресценции TMB-PC при нарушении переноса энергии. Образцы L-MlphDG-GM₁ (10%) — круглый маркер и L-MlphDG-CMG-PE (10%) — квадратный маркер, L-MlphDG-PI (10%) — треугольный маркер.

В случае липосом с фосфатидилинозитом основной прирост интенсивности флуоресценции донора наблюдался в первые минуты после разбавления и начала инкубации образцов, что отражает быстрый переход к равновесному распределению зондов в системе «липидный бислой—водная фаза». Липосомы с GM₁ после длительной инкубации показали небольшой рост сигнала, вероятнее всего, из-за постепенной диссоциации GM₁ в водную фазу с образованием

смешанных с зондами мицелл (склонен к мицеллообразованию, ККМ $GM_1 \sim 10^{-5}M$), что и повлияло на расстояние между метками и снижение эффективности переноса.

При инкубации в сыворотке для всех трех образцов наблюдалось разгорание флуоресценции донора как следствие нарушения переноса энергии (**Рисунок 16**). Для образца с PI доля от максимальной интенсивности ($F_v=1$) была наибольшей ~ 0.8 уже через 2 часа инкубации. Параллельно мы наблюдали практически полное удерживание кальцеина во внутреннем водном объеме в этом временном интервале (**Рисунок 13А**). Значит перенос энергии прекращается не из-за разрушения бислоя и расхождения меток в пространстве, а скорее всего за счет образования плотной белковой короны, которая может экранировать перенос, внедряясь во внешний слой липидов и увеличивая расстояние между флуорофорами. Но везикулярная структура липосом при этом сохраняется.

Следуя той же логике, можно сделать вывод, что липосомы с SMG-PE и GM_1 также не разрушаются в сыворотке. Более того, они лучше экранированы от взаимодействий с белками, чем липосомы с PI, так как показали меньшее и гораздо более медленное разгорание флуоресценции донора (**Рисунок 16**). По-видимому, липосомы с SMG-PE наиболее эффективно защищены от белков, так как к 5 ч инкубации сигнал флуоресценции достиг лишь 50% от максимального, а в случае GM_1 -липосом – 65 %. Полученные результаты не противоречат нашим предположениям о возникновении микротрещин в мембране (см. выше) и позволяют сделать вывод о том, что на поверхности липосом с SMG-PE формируется наиболее рыхлая белковая корона.

Спустя сутки инкубации уровень флуоресценции всех образцов выравнивался. Мы предполагаем, что это происходит из-за постепенного образования комплексов зондов с белками за счет взаимодействий с флуорофорами и уменьшения концентрации зондов в липидном бислое.

4.2.2.3. Исследование удерживания пролекарства в бислое липосом

В полной сыворотке происходило вытекание кальцеина за счет, видимо, образование микротрещин/пор (**Рисунки 13 и 14А**). Для ответа на вопрос, удерживается ли само пролекарство в бислое, мы получали липосомы, содержащие 1 мольн. % его флуоресцентномеченого аналога (**Per-MlphDG**, **Рисунок 17**), и инкубировали их в буфере или сыворотке в течение 0, 1.5 и 4 ч при 37°C.

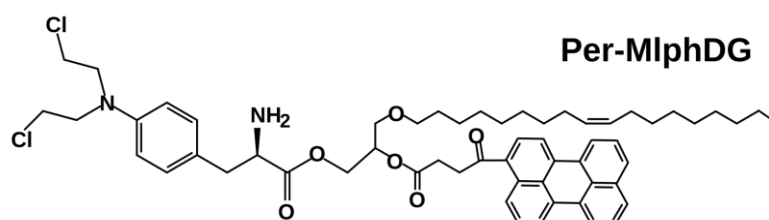


Рисунок 17. Структура периленоильного производного пролекарства мелфалана

После инкубации проводили гель-проникающую хроматографию смесей на колонке с сефарозой CL-4В, чтобы разделить на фракции липосом, белков сыворотки и мицелл. Фракции, содержащие 100-нм липосомы, элюируются сразу после выхода свободного объема колонки, частицы меньшего размера обнаруживаются в более поздних фракциях. Для каждой фракции измеряли сигнал флуоресценции.

Для липосом с 10% PI в буфере уровень флуоресценции во фракциях с липосомами не изменялся за 4 ч, и в поздних фракциях флуоресценции не обнаруживалось (**Рисунок 18**). Следовательно, молекулы Per-MlphDG удерживаются в бислое в данных условиях.

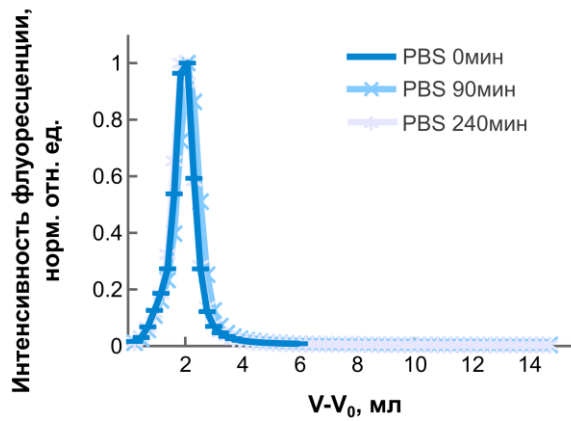


Рисунок 18. Профили элюции липосом *L-MlphDG-PI* (10%), меченных Per-MlphDG, после инкубации в буфере в течение 4 ч.

Для экспериментов в сыворотке выбрали три образца липосом: с наименьшим (2% GM₁) и наибольшим (10% CMG-PE) уровнями вытекания кальцеина и средним значением CR (10% PI). К 4-му часу инкубации во всех трех случаях наблюдалось схожее падение уровня флуоресценции во фракциях, содержащих липосомы (**Рисунок 19**), но при этом сигнал флуорофора в последующих фракциях не детектировался. Изменения за 1.5 и 4 ч представлены в таблице 2.

Таблица 2. Изменение сигнала флуоресценции Per-MlphDG в липосомах различного состава при инкубации в сыворотке

Время, ч	Снижение уровня флуоресценции липосом, %		
	<i>L-MlphDG-PI</i>	<i>L-MlphDG-GM₁</i>	<i>L-MlphDG-CMG</i>
1.5	30.6	13.7	11.3
4	40.7	31.9	30.2

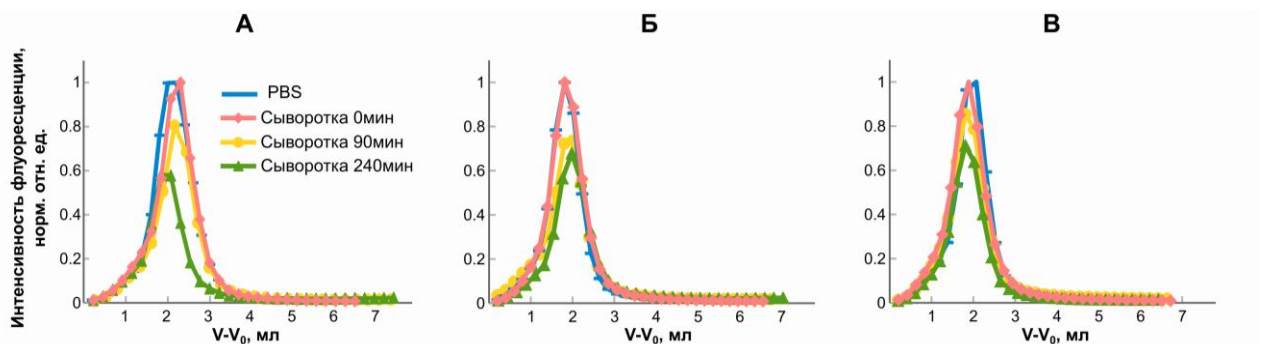


Рисунок 19. Профили элюции липосом с Per-MlphDG после инкубации. **А:** *L-MlphDG-PI* (10%), **Б:** *L-MlphDG-GM₁* (2%), **В:** *L-MlphDG-CMG-PE* (10%).

Предположительно, при потере равного количества пролекарства, наблюдался бы и одинаковый уровень высвобождения кальцеина (равные значения CR). Но значение CR для липосом с 2% GM₁ и 10% SMG-PE отличается на порядок, а уровень флуоресценции Per-MlphDG одинаков. Отсутствие сигнала флуорофора во фракциях после выхода липосом свидетельствует об отсутствии мицелл с Per-MlphDG. Поэтому снижение уровня флуоресценции в пике липосом связано с состоянием самого флуорофора. Мы считаем, что тушение флуоресценции обусловлено белками, ассоциированными с мембраной. Ранее показано, что квантовый выход периленоильной группы самой молекулы Per-MlphDG понижается в 1.7 раза под влиянием остатка мелфалана [226], который является производным фенилаланина. Также, ранее тушение флуоресценции периленоила наблюдали при взаимодействии белков с мембранами за счет повышения проницаемости мембран для воды (неопубл. данные). Интересно, что тушение в данном случае коррелирует с экранирующей способностью амфифилов: более медленное снижение сигнала флуоресценции характерно для липосом с объемистыми и/или протяженными структурами полярных групп GM₁ и SMG-PE на поверхности, где белкам труднее заглубиться, а для относительно маленького остатка *мио*-инозита то же снижение сигнала Per-MlphDG достигается за временной промежуток в 2.5 раза короче.

Следовательно, в условиях образования белковой короны все исследованные формуляции липосом сохраняют пролекарство мелфалана в мембране.

4.2.2.4. Изучение взаимодействий альбумина с липосомами с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье

Поскольку альбумин представляет 50-55 % суммарного белка плазмы, представляло интерес исследовать его взаимодействия с мембраной липосом с пролекарством мелфалана на субмолекулярном уровне с помощью метода ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR). Спектроскопия FTIR широко

применяется в структурных исследованиях белков в связи с исключительно высокой чувствительностью к конформационным изменениям белков в ходе функциональных переходов или при межмолекулярных взаимодействиях, в том числе с липидными мембранами [252]. В свою очередь, в варианте спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) этот метод применяется и для изучения структурных изменений в липидном бислое.

Мы использовали бычий сывороточный альбумин (BSA) в качестве модельного белка плазмы, поскольку он высоко гомологичен сывороточному альбумину человека. Сначала получали ИК-спектр липосом в буфере PBS, а затем добавляли альбумин и инкубировали в течение 20 мин при 37°C. В ходе инкубации записывали спектры через каждые 5 минут и определяли изменения в положениях и площадях пиков. Для изучения влияния пролекарства на взаимодействие бислоя с белком записывали спектры образцов липосом, состоящих только из ePC или с добавлением защитных молекул (PI, GM₁, CMG-PE), а затем сравнивали их со спектрами MlphDG-содержащих липосом аналогичного состава.

Характер взаимодействия липосом с альбумином изучали по изменениям в структуре как липидного бислоя, так и самого белка. Изменения в липидном бислое можно детектировать по характеристическим полосам поглощения валентных колебаний групп CH₂, C=O и PO₂⁻ (**Рисунок 20**). Асимметричные (~2920 см⁻¹) и симметричные (~2850 см⁻¹) валентные колебания CH₂-групп чувствительны к изменениям в гидрофобной области и отражают характер упаковки бислоя [254], [255]. В полярной части бислоя полосы поглощения карбонильных (1715-1745 см⁻¹) и фосфатных групп (1220-1260 см⁻¹) реагируют на изменения микроокружения – нарушение связей с молекулами воды раствора и образование связей с внесенными лигандами – например, положительно заряженными аминокислотными остатками пептидов или белков [256], [257]. Мы анализировали изменения в положениях пиков валентных колебаний CH₂ и C=O. После деконволюции пиков C=O рассчитывали процент содержания

карбонильных групп с высокой и низкой степенью гидратации исходя из площадей пиков отдельных компонентов относительно интеграла анализируемого участка спектра. Изменения в полосе поглощения фосфатных групп отчасти дублируют информацию об изменении микроокружения, поэтому деконволюцию и анализ полученных пиков для сигнала PO_2^- не проводили.

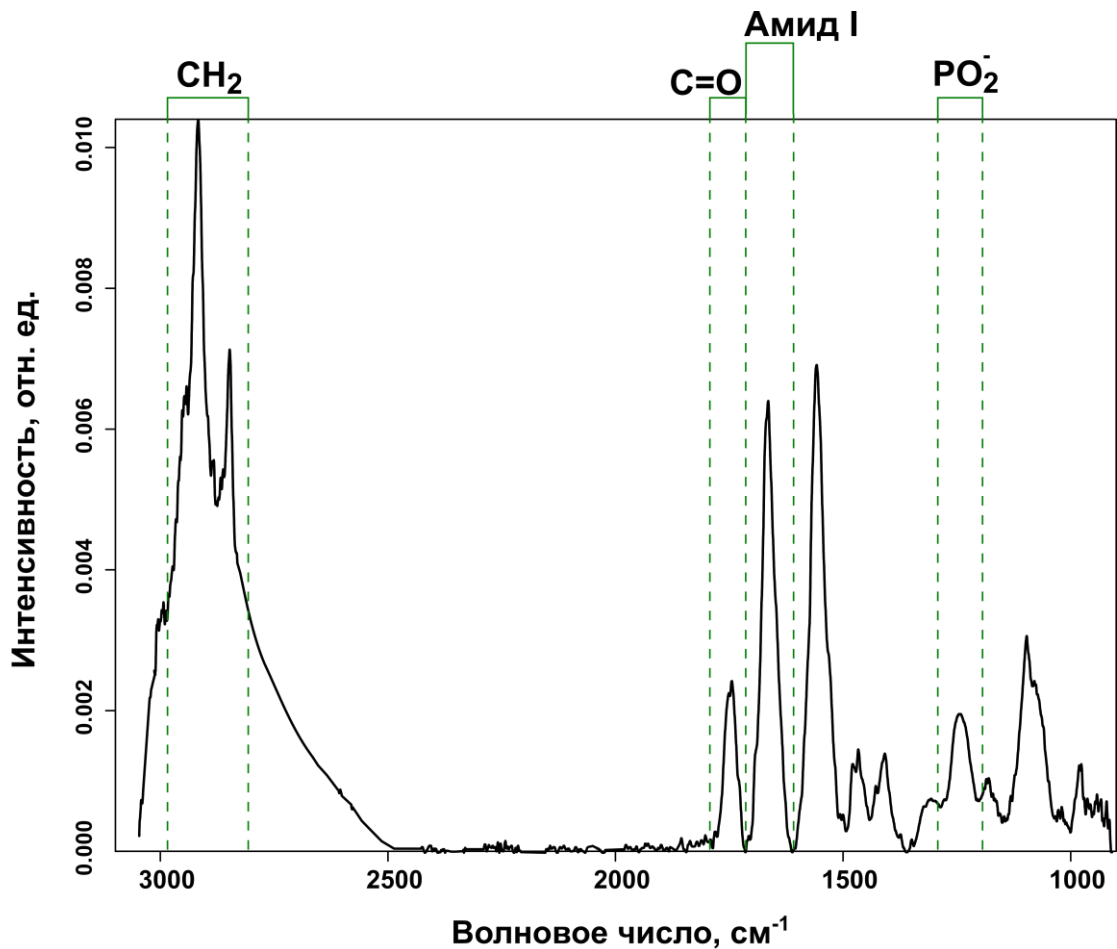


Рисунок 20. Пример ИК-спектра липосом *L-MlphDG* в ходе инкубации с *BSA*.

Изменение вторичной структуры белка при контакте с бислоем детектируется как перераспределение интенсивностей сигналов элементов этой структуры – α -спирали/ β -листа/ β -поворота/неупорядоченной цепи, в пике амид I (1628-1685 cm^{-1}). Появление агрегатов белка соответствует пикам поглощения β -листа в областях частот $1624 \pm 1 \text{ cm}^{-1}$ и $1696 \pm 2 \text{ cm}^{-1}$ [258]. Перераспределение интенсивностей сигналов после анализа и деконволюции участка спектра Амид I выражали в изменении % содержания структурных элементов белка.

Для всех образцов липосом валентные колебания углеводородных цепей соответствуют неупорядоченной жидкокристаллической фазе бислоя (Таблица 3) [259].

Таблица 3. Частоты колебаний CH_2 -групп для липосом*

Состав (мольн.)/обозначение липосом	До инкубации		5-мин инкубация с BSA		20-мин инкубация с BSA	
	$\nu_{\text{асим}}$	$\nu_{\text{сим}}$	$\nu_{\text{асим}}$	$\nu_{\text{сим}}$	$\nu_{\text{асим}}$	$\nu_{\text{сим}}$
<i>ePC/L</i>	2924	2853	2924	2853	2924	2853
<i>ePC-MlphDG, 9:1/L-MlphDG</i>	2925	2852	2926	2853	2927	2853
<i>ePC-PI, 9:1/L-PI</i>	2923	2853	2924	2853	2926	2853
<i>ePC-MlphDG-PI, 8:1:1/L-MlphDG-PI</i>	2924	2853	2924	2853	2924	2853
<i>ePC-GM₁, 9:1/L-GM₁</i>	2923	2853	2923	2853	2923	2853
<i>ePC-MlphDG-GM₁, 8:1/L-MlphDG-GM₁</i>	2924	2853	2924	2853	2924	2853
<i>ePC-CMG, 9:1</i>	2922	2853	2924	2853	2924	2853
<i>ePC-MlphDG-CMG, 8:1:1/L-MlphDG-CMG</i>	2924	2852	2924	2854	2924	2854

*Отметим, что сдвиг частот валентных колебаний на 1 см^{-1} – значимая величина в ИК-спектроскопии Фурье [253]

При инкубации липосом L с BSA изменения в области пиков CH_2 не наблюдались (таблица 3). Анализ участка спектра, отражающего изменения гидратации в области липидных карбонильных групп [257], [260] в ходе инкубации с альбумином, показал расщепление максимума пика 1733 см^{-1} (**Рисунок 21А**) на позиции 1731 см^{-1} и 1738 см^{-1} (**Рисунок 21Б**). Это расщепление свидетельствует о появлении различий в степени гидратации среди карбонильных групп при взаимодействии с альбумином. Компоненты деконволюции спектра в положениях 1731 см^{-1} и 1723 см^{-1} соответствуют высокогидратированным карбонилам, сохранившим связь с водой. Компоненту в положении 1738 см^{-1} можно рассматривать как сигнал отчасти дегидратированных карбонильных групп.

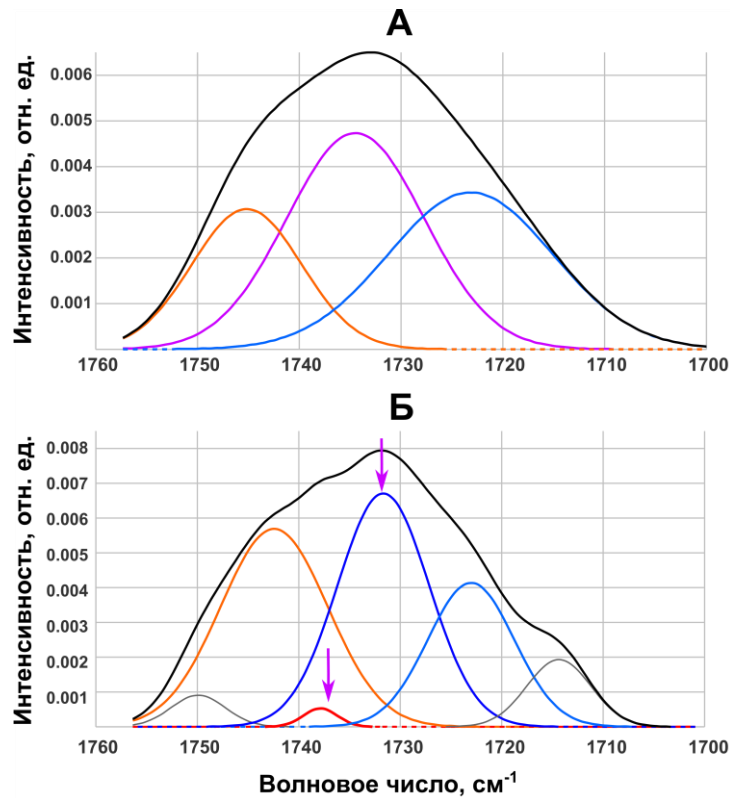


Рисунок 21. *А:* Участок ИК-спектра липосом *L*, отражающий область валентных колебаний липидных групп $C=O$ (черная кривая), и его деконволюция на составляющие компоненты (цветные кривые). *Б:* Участок ИК-спектра липосом *L* после 10 мин инкубации с *BSA* (черная кривая) и его деконволюция на составляющие компоненты (цветные кривые); стрелками отмечены пики расщепления исходного пика 1733 см^{-1} .

В присутствии *BSA* уменьшается площадь под кривыми высокогидратированных компонент (голубая и синяя кривые, **Рисунок 21**) и возрастает вклад карбонильных групп с низкой степенью гидратации (оранжевая и красная кривые). Изменение суммарных площадей под кривыми для карбонильных групп с высокой степенью гидратации в ходе инкубации отражены на **рисунке 22А** в виде % от общей площади пика $C=O$. Степень гидратации уменьшается уже через 5 мин после добавления альбумина и сохраняется до 20 мин. Это свидетельствует о формировании альбумином белковой короны на поверхности ePC-липосом. Белок разрывает водородные связи карбонильных групп липидного бислоя с молекулами воды и, вероятно, замещает их собой. Его внедрения в равномерный бислой ePC не происходит, так как нет влияния на подвижность углеводородных цепей (Таблица 3).

Вместе с изменениями в карбонильной области липидов наблюдалось уменьшение процента α -спиральных участков в структуре BSA и увеличение вклада структур β -листа и β -поворота в % от общей площади пика Амид I (Рисунок 22Б). В литературе сообщается о возможном изменении конформации белков при сорбции, особенно, если они мультидоменные [155]. Частичную денатурацию наблюдали для альбумина, лизоцима, химотрипсина и цитохрома с [34], [261], [262]. Для альбумина есть данные о возрастании вклада β -компонентов при взаимодействии с катионными золотыми наночастицами [34], [214].

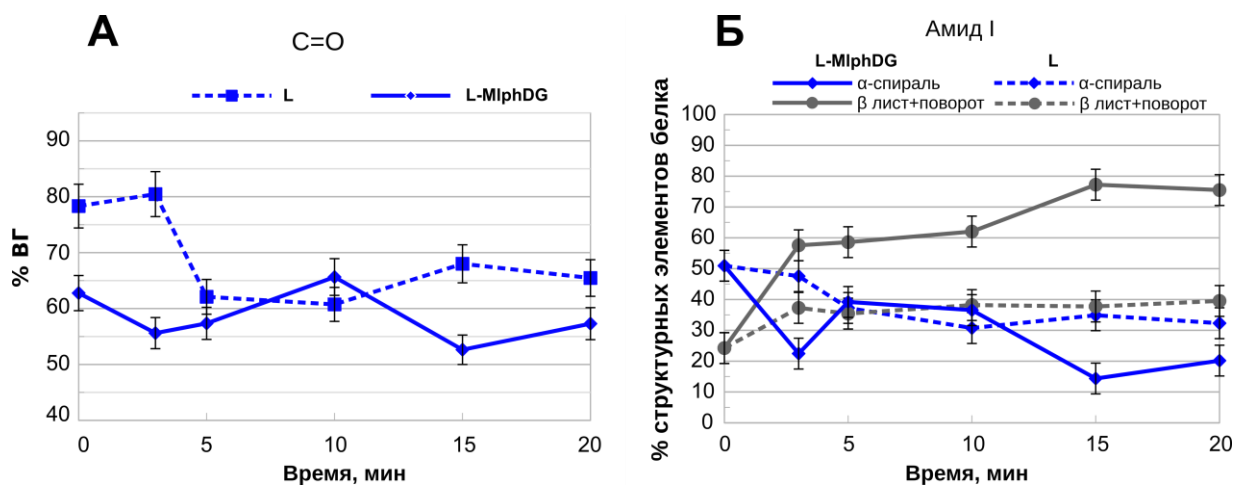


Рисунок 22. А: Изменение процента высокогидратированных карбонильных групп липидов (ВГ) в ходе инкубации с альбумином; **Б:** Изменение процента структурных элементов альбумина в ходе инкубации с липосомами. Приведены данные репрезентативного эксперимента \pm SE. В качестве стандартной ошибки использована погрешность метода деконволюции спектров.

Введение молекул пролекарства MlphDG в бислой создает некоторые локальные дефекты поверхности. Как следствие, можно ожидать изменений во взаимодействиях с альбумином. Действительно, в этом случае наблюдается изменение подвижности цепей CH_2 – максимумы пиков валентных колебаний сдвигаются в сторону больших волновых чисел, что свидетельствует об увеличении неупорядоченности гидрофобных цепей бислоя (Таблица 3). Большая неупорядоченность в ходе инкубации говорит о внедрении белка. Количество агрегатов BSA изменяется колоколообразно — оно максимально на 10 минуте инкубации, а затем снижается (Рисунок 23).

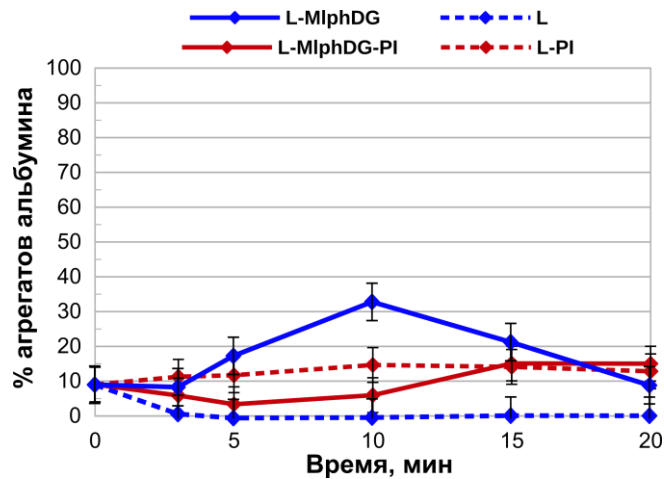


Рисунок 23. Изменение процента агрегатов альбумина в ходе инкубации с липосомами. Приведены данные репрезентативного эксперимента $\pm SE$. В качестве стандартной ошибки использована погрешность метода деконволюции спектров.

Амплитуда изменений составляет 20%, для других образцов липосом (**Рисунок 23**) мы не наблюдали таких сильных изменений степени агрегации. Очевидно, это связано с зарядом поверхности, вносимым остатком мелфалана в отсутствие экранирующих амфифилов. Липосомы L-MlphDG — единственный положительно заряженный образец, провоцирующий активную адсорбцию альбумина и увеличение числа агрегатов. В ходе инкубации молекулы белка на поверхности липосом должны найти наиболее выгодную конформацию, поиск которой, как мы считаем, и сопровождается уменьшением процента альфа-спиралей и изменением числа агрегатов белка. Количество высокогидратированных карбонильных групп липидов (**Рисунок 22А**) изменяется симбатно с количеством агрегатов альбумина (**Рисунок 23**). Введение пролекарства в бислой сильно снижает процент карбонильных групп с высокой степенью гидратации в самих липосомах (**Рисунок 22А**, точка 0) — часть связей с водой заменяет взаимодействие с пролекарством. Мы предполагаем, что добавление BSA нарушает существующие в приполярной зоне липидного бислоя водородные связи и вызывает их перегруппировку в ходе поиска белком новой равновесной конформации. Структура белка постоянно изменяется в течение инкубации до достижения предположительного равновесия. К 20-й минуте

большая часть белка находится в конформации β -поворота и β -листа (**Рисунок 22Б**).

Введение 10% фосфатидилинозита в бислои из ePC также вносит определенные дефекты, что облегчает взаимодействия с альбумином. При добавлении BSA увеличивается текучесть бислоя: наблюдается сдвиг пика асимметричных колебаний $\text{C}=\text{O}$ на 1 см^{-1} уже через 5 мин, а к 20 мин инкубации сдвиг достигает 3 см^{-1} (Таблица 3). Белок влияет и на высокогидратированные карбонильные группы липидов.

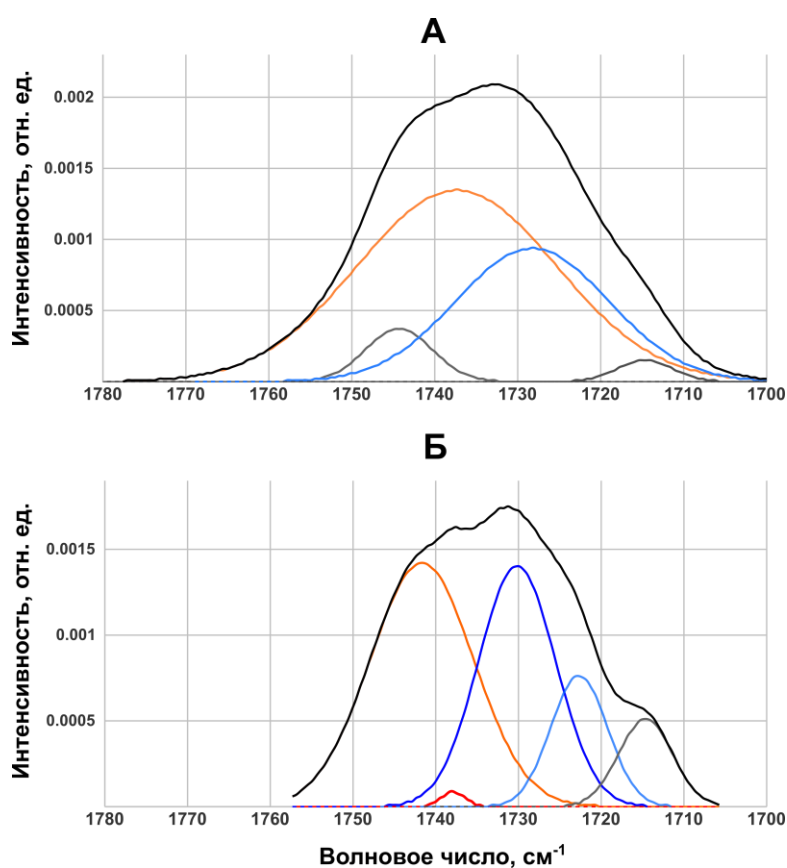


Рисунок 24. *А: Участок ИК-спектра липосом L-PI, отражающий область валентных колебаний липидных групп $\text{C}=\text{O}$ (черная кривая) и его деконволюция на составляющие компоненты (цветные кривые). Б: Участок ИК-спектра липосом ePC-PI после 10 мин инкубации с BSA (черная кривая) и его деконволюция на составляющие компоненты (цветные кривые).*

При деконволюции спектров, после добавления альбумина наблюдается расщепление пика из положения 1727 см^{-1} (**Рисунок 24А**) в позиции 1731 см^{-1} и 1723 см^{-1} , а также уменьшение площади под кривыми (**Рисунок 24**). Этот

результат свидетельствует об уменьшении на поверхности липосом карбонильных групп с высокой степенью гидратации (**Рисунок 25А**). Динамическое изменение гидратации и возвращение к исходной степени для карбониллов бислоя через 20 мин инкубации отражает реорганизацию белка на поверхности липосом и создание новых связей с молекулами воды после установления равновесного состояния. Реорганизация структуры белка приводит к уменьшению числа α -спиральных участков (**Рисунок 25Б**). Альбумин переходит в конформацию с большим содержанием β -структурных компонентов и, исходя из изменений в CH_2 - и $\text{C}=\text{O}$ -областях, можно сделать вывод, что белок заякоривается в бислое, взаимодействуя с карбонильными группами липидов.

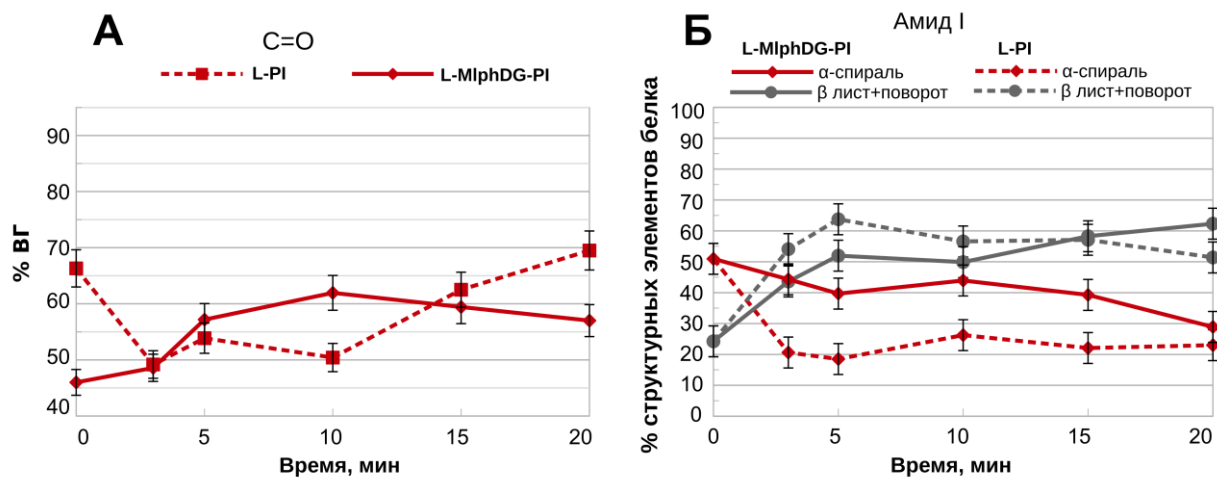


Рисунок 25. **А:** Изменение процента высокогидратированных (ВГ) карбонильных групп липидов в ходе инкубации с альбумином; **Б:** Изменение процента структурных элементов альбумина в ходе инкубации с липосомами. Приведены данные репрезентативного эксперимента \pm SE. В качестве стандартной ошибки использована погрешность метода деконволюции спектров.

Хотя по отдельности MlphDG и PI создают определенные дефекты в бислое, липосомы с 10% пролекарства и 10% фосфатидилинозита, наоборот, не позволяют альбумину глубоко внедриться в бислое. При инкубации с BSA не было зарегистрировано влияния на подвижность алифатических цепей (Таблица 3). Процент карбонильных групп с высокой степенью гидратации увеличивался лишь первые 5 минут (**Рисунок 25А**), что может свидетельствовать о появлении гидратной оболочки альбумина вблизи этих карбониллов. Видимо, белок создает

слабосвязанную корону на поверхности бислоя без его нарушения (агрегация белка увеличивалась лишь незначительно, а процент α -спиральных участков уменьшался) (**Рисунок 23 и 25Б**). Переход конформации альбумина из преимущественно α -спирали к совокупности β -компонентов и неупорядоченной цепи происходит не столь резко, как в случае липосом L-PI (**Рисунок 25Б**). Очевидно, это обусловлено более «гладкой», равномерной структурой поверхности липосом L-MlphDG-PI, где объемистая отрицательно заряженная головная группа фосфатидилинозита скомпенсирована небольшим положительно заряженным остатком мелфалана. Правда, к концу инкубации финальная конформация белка сильно изменена и почти не отличается для обоих вариантов липосом. Однако она не достигает предельных значений, которые наблюдались для положительно заряженных липосом L-MlphDG (**Рисунок 22Б**).

Наличие в бислое 10% пептидолипида SMG-PE, независимо от присутствия пролекарства MlphDG, изменяет положение одного из пиков валентных колебаний CH_2 -цепей в сторону более упорядоченного бислоя (Таблица 3). Добавление альбумина уменьшает упорядоченность бислоя для обоих видов липосом с SMG-PE. Конформация белка при сорбции на поверхности липосом, по-видимому, определяется SMG-конъюгатом, так как добавление пролекарства мелфалана не повлияло на структуру BSA (**Рисунок 26А**): процент α -спиральных участков одинаково уменьшался, а вклад β -листа и β -поворота увеличивался. По-видимому, образование белковой короны почти не затрагивает поверхность липидов и белок концентрируется в пространстве рядом с олигоглицином. Возможно, такое взаимодействие влияет на подвижность гидрофобной части SMG-конъюгата и в целом алифатических цепей липидного бислоя.

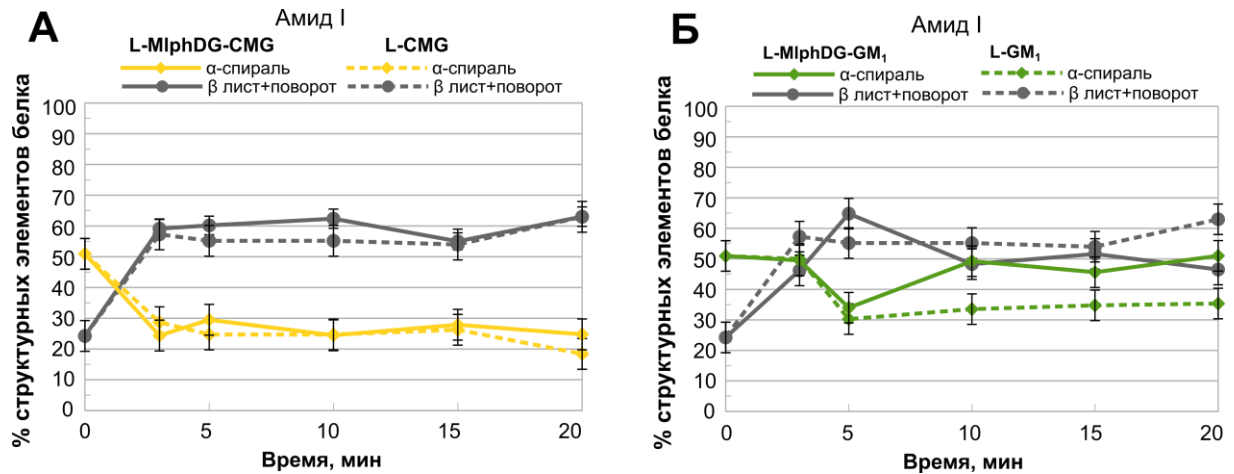


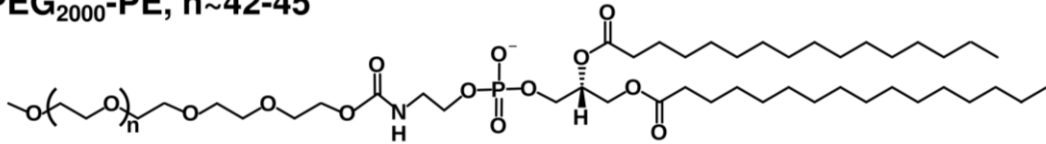
Рисунок 26. Изменение процента структурных элементов альбумина в ходе инкубации с CMG-липосомами (А) или GM₁-липосомами (Б). Приведены данные репрезентативного эксперимента ± SE. В качестве стандартной ошибки использована погрешность метода деконволюции спектров.

Введение в жидкофазный бислой ганглиозида GM₁ не повлияло на упорядоченность гидрофобной области липосом L-GM₁ и L-MlphDG-GM₁. При формировании короны из альбумина ганглиозид защищает поверхность от проникновения белка - изменений в области CH₂-пиков не наблюдалось (Таблица 3). Конформация самого белка в ходе сорбции изменялась (**Рисунок 26Б**) - вклад β-структурных компонентов увеличивался, однако для образца L-MlphDG-GM₁ изменения в структуре альбумина были минимальными по сравнению со всей серией липосом. Можно заключить, что ганглиозид защищает поверхность Mlph-липосом лучше, чем фосфатидилинозит.

В целом, результаты исследований с помощью ИК-спектроскопии согласуются с данными флуоресцентных методов.

4.2.3. Исследование эффектов липидного конъюгата полиэтиленгликоля в липосомах с пролекарством мелфалана

Поскольку липидный конъюгат PEG₂₀₀₀ (PEG-PE, **Рисунок 27**) активно используется для стабилизации липосом в кровотоке [8], [9], [263], мы также решили исследовать его защитные свойства в липосомах с MlphDG.

PEG₂₀₀₀-PE, n~42-45**Рисунок 27.** Структура липидного конъюгата PEG-PE.

Липосомы с 2 и 10 % PEG-PE получали стандартным методом экструзии и характеризовали аналогично описанным выше образцам липосом с другими экранирующими молекулами (Таблица 4). Аналогичным же способом получали образцы липосом, содержащие раствор кальцеина в самозатухающей концентрации и инкубировали их в 80%-ной сыворотке крови человека. (Эксперименты проводились на одних и тех же партиях сывороток для всех образцов липосом с различными экранирующими компонентами)

Таблица 4. Состав и физико-химические характеристики липосом, измеренные методом анализа траекторий наночастиц (NTA)

Состав бислоя	Диаметр, нм*	Интенсивность рассеяния, усл.ед.*	Дзета-потенциал, мВ**
ePC-MlphDG-PEG-PE (2%)	88 ± 2	3.5 ± 0.2	+9
ePC-MlphDG-PEG-PE (10%)	88 ± 1	3.4 ± 0.1	-10

*Приведены доверительные интервалы (p = 95%)

**Измерены с помощью фотонной корреляционной спектроскопии; данные для 200-нм липосом

При анализе интенсивностей рассеяния отдельных липосом и числа липидов в них (данные не приведены), было обнаружено, что образец с 10% PEG-PE отличается достоверно меньшими значениями обоих параметров. Внешний диаметр липосом был задан при экструзии и одинаков у полученных образцов (Таблица 4). Из-за объемистости цепей PEG₂₀₀₀, при фиксированном внешнем диаметре, диаметр липидной сферы и число липидов на липосому оказывается меньше, чем для липосом с 2 % PEG-PE.

Жидкофазные липосомы на основе яичного фосфатидилхолина с 2 и 10 % PEG-PE оказались не самыми стабильными системами. Даже в буфере флуоресценция кальцеина начинала расти через 1 час, а в сыворотке его вытекание наблюдалось с самого начала инкубации (**Рисунок 28**). Образец с 2% PEG-липидов высвобождал кальцеин в сыворотке в первые 30 мин, причем сигнал флуоресценции возрастал не линейно или S-образно, а от опыта к опыту воспроизводил синусоидального типа флуктуации (соответственно, значения CR) в ходе всей инкубации, с выходом на максимальное значение в первые 30 мин и сохранением этого максимума через сутки (**Рисунок 28А**). Снижение сигнала флуоресценции характерно для локального концентрирования флуорофора и его самотушения.

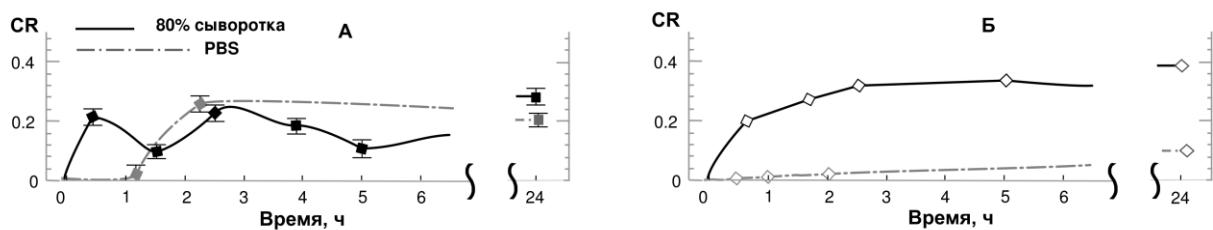


Рисунок 28. Уровень высвобождения кальцеина из липосом в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир), где CR – доля свободного кальцеина в растворе. А: образец L-MlphDG-PEG-PE (2%), Б: образец L-MlphDG-PEG-PE (10%).

Мы предполагаем, что при инкубации в сыворотке молекулы PEG-PE диссоциируют из бислоя в виде мицелл с захватом других компонентов и кальцеина. В сложной коллоидной системе, состоящей из белков, липидов, PEG-липидов, кальцеина и детергента Triton X-100 могут образовываться самые разнообразные мицеллярные фазы, что в итоге дает такую необычную динамику кривой высвобождения кальцеина. Данный метод анализа не позволяет определить структуры этих мицелл и изучить возможный обмен PEG-липидов между ними, но очевидно, что липидный бислой липосом с 2% PEG-PE нестабилен. В литературе сообщается о выходе PEG₂₀₀₀-модифицированных липидов из мембран липосом посредством диффузии или образования мицелл

[264]. Влияние на скорость диффузии из мембраны оказывает сила гидрофобных взаимодействий внутри бислоя: чем длиннее ацильная цепь конъюгата, тем сильнее взаимодействие с липидами [265]. Авторы [266] наблюдали, что перенос конъюгата с двумя пальмитоильными или двумя олеоильными (C16:0 и C16:1) остатками из липосом состава DSPC–Chol–PEG-PE, 50:45:5 (мольн. %), на липидную мембрану-акцептор при 37°C происходит быстрее, чем перенос конъюгата с двумя стеароильными (C18:0) остатками в тех же условиях. В отсутствие мембраны-акцептора этот процесс был едва заметен [267]. Также при введении в бислой менее 4 мольн. % конъюгата, PEG-цепи принимают спутанную конформацию [268], и их площади может быть недостаточно для покрытия поверхности и защиты от внедрения белков. Внедряясь в свободное пространство на поверхности бислоя, белки сыворотки могут нарушить существующие гидрофобные контакты, тем самым облегчая выход PEG₂₀₀₀-липид. При увеличении содержания PEG-PE до 10% характер кривой вытекания кальцеина изменялся, но его удерживание при инкубации в сыворотке не улучшалось (**Рисунок 28Б**). Увеличение % PEG₂₀₀₀-липид увеличивает отрицательный заряд поверхности (за счет фосфатной функции) и изменяет конформацию PEG₂₀₀₀ на более вытянутую (что согласуется с нашими данными о диаметре липидной сферы, см. выше), что снижает степень взаимодействия с белками и затрудняет выход из бислоя в мицеллы. Однако этого недостаточно для защиты бислоя и предотвращения образования микроканалов, через которые выходит кальцеин. Не исключена и вероятность выхода компонентов бислоя, в том числе пролекарства.

Действительно, липосомы с 10% PEG-PE и флуоресцентным производным Per-M1phDG спустя полтора часа инкубации в сыворотке демонстрировали выход пролекарства в мицеллярную фазу (**Рисунок 29Б**). После инкубации в буфере липосомы сохраняли стабильность – кривые элюции разных времен инкубации полностью совпадали (**Рисунок 29А**). В предыдущих экспериментах с другими экранирующими молекулами мы не наблюдали подобного влияния белков плазмы (**Рисунок 19**).

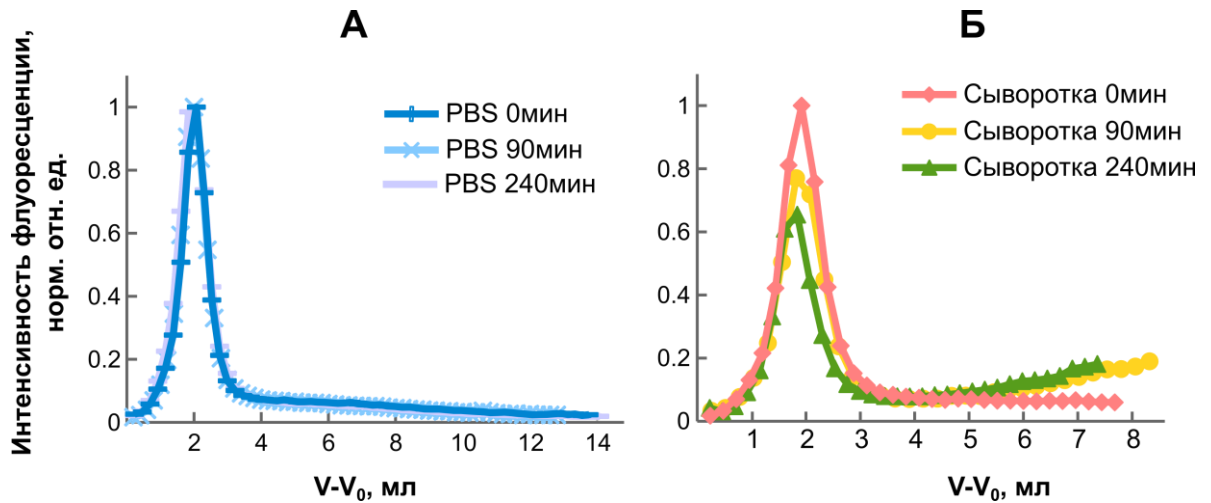


Рисунок 29. Профили элюции липосом *L-Per-MlphDG-PEG-PE* (10%) после инкубации в буфере (А) и сыворотке (Б).

Высокой стабильностью обладают липосомы с плотно упакованным и дегидратированным липидным бислоем (цит. из [268]). Так называемая жидкокристаллическая упорядоченная фаза (liquid ordered, LO) бислоя, которая формируется при наличии в липидном составе не менее 1/3 части молекул холестерина, образует наиболее конденсированный, плотно упакованный бислой, лишенный фазовых переходов [269]. Стабилизирующий эффект полиэтиленгликольных цепей (2000 Да и выше) обусловлен тем, что они дегидратируют липидный бислой [270]. Показано [268], что плотность упаковки и дегидратация липидного бислоя на основе смеси гидрогенизированного соевого фосфатидилхолина (HSPC) и холестерина в соотношении 3:2 (мольн.) максимальны при включении в бислой 7 ± 2 мольн. % PEG₂₀₀₀-липида. Но в отсутствие холестерина параметры упаковки бислоя из HSPC в широком интервале концентраций PEG₂₀₀₀-липида (до 30 %) больше соответствуют мицеллярной фазе, то есть такие липосомы должны быть наименее стабильны. HSPC ($T_m 52^\circ\text{C}$) образует бислой в гель фазе (SO, solid ordered), аналогично DSPC.

Для более аккуратных сравнений с литературными данными мы заменили матричный липид ePC в образцах на DSPC-Chol (30 % холестерина в составе липосом) или DSPC. Замена ePC на DSPC способствовала сохранению липосом только в буфере. В сыворотке наблюдалось полное разрушение липосом с 2%

PEG-PE за первый час инкубации, причем ход кривой CR свидетельствует о практически мгновенном разрыве жесткой мембраны (по типу лопнувшего воздушного шарика) под действием белков (**Рисунок 30**). Также, как и в случае DSPC липосом с ганглиозидом GM₁ и конъюгатом карбоксилированного олигоглицина SMG-PE, жесткий бислои не успевают закрыть образующиеся поры и происходит быстрое высвобождение флуорофора из внутреннего водного объема. Для образца с 10% PEG-PE замена матрицы ePC на DSPC мало повлияла на кинетику вытекания кальцеина (сравнение **Рисунка 28Б** и **Рисунка 30**), разве что в случае DSPC начальная более быстрая фаза заняла менее 1 ч, в отличие от 3 ч для жидкофазных липосом, но через несколько часов уровень высвобождения кальцеина был одинаков (CR~ 0.4). Таким образом, бислои с 10% PEG-PE лучше экранированы от воздействий белков, чем с 2% PEG-PE, и выход в мицеллы PEG-PE менее вероятен или происходит со значительно меньшей скоростью.

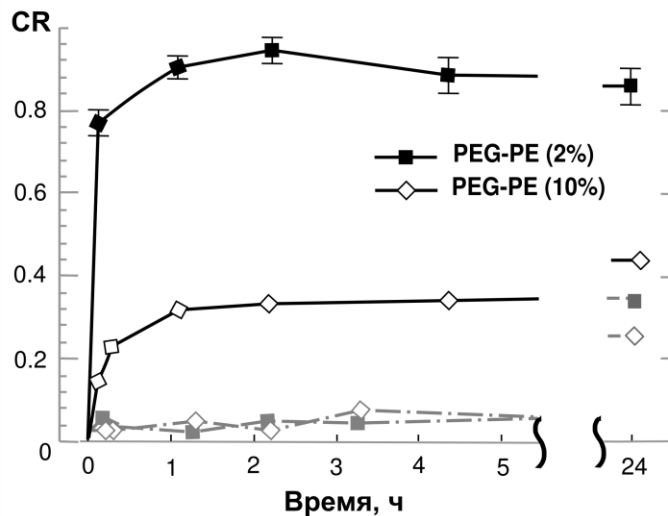


Рисунок 30. Уровень высвобождения кальцеина, где CR – доля свободного кальцеина в растворе, из липосом DSPC–MlphDG–PEG-PE с 2 и 10% PEG-PE в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир).

Добавление 30 мольн. % холестерина значительно увеличило стабильность бислоя с 10% PEG-PE. Высвобождение кальцеина в сыворотке замедлилось и приблизилось к уровню, наблюдаемому в буфере – за 24 ч инкубации доля флуорофора вне липосом не превысила 0.15 единиц (**Рисунок 31**).

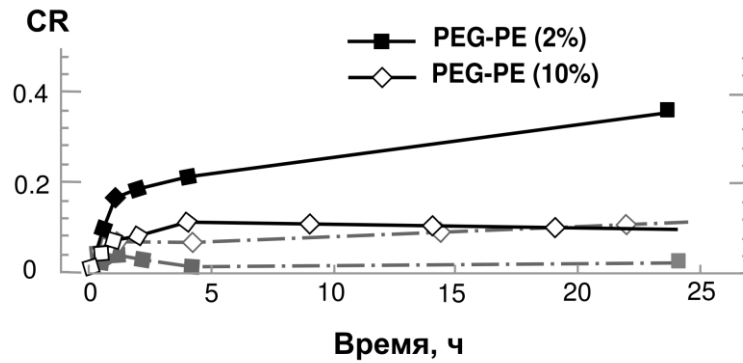


Рисунок 31. Уровень высвобождения кальцеина, где CR – доля свободного кальцеина в растворе, из липосом DSPC–Chol–MlphDG–PEG-PE с 2 и 10% PEG-PE в сыворотке (сплошные кривые) и буфере (пунктир).

Для образца с 2% PEG-PE динамика вытекания кальцеина в сыворотке приблизилась к таковой для DSPC-липосом с 10% PEG-PE без холестерина (Рис. 25), и значение CR осталось довольно высоким – ~ 0.4 за сутки. Следовательно, 2% PEG-PE недостаточно для стабилизации бислоя даже в жидкокристаллической упорядоченной фазе.

Таким образом, наши результаты согласуются с литературными данными о том, что наибольшей стабильностью обладают липосомы, имеющие LO-фазу бислоя и содержащие достаточное количество PEG₂₀₀₀-липидов. Напротив, пегилированные липосомы с твердой мембраной в фазе геля наименее стабильны.

5. Заключение

Результаты настоящего исследования позволяют составить представление о состоянии в плазме крови липосомальных систем доставки на основе природных фосфолипидов двух химиотерапевтических агентов различного типа действия в виде липофильных пролекарств. В отличие от липосом с пролекарством мелфалана, липосомы с пролекарством метотрексата экспонируют на поверхности мембраны объемистые остатки лекарства, к тому же содержащие реакционноспособные функциональные группы (амино- и карбоксильную). В плазме крови МТХ-липосомы запускают фрагментацию белка С3 системы комплемента, что согласуется с ранними данными об активации СК в тестах *in vitro* при введении МТХ-липосом в кровь. Следствием этого, как показано *ex vivo* в крови, является активный захват МТХ-липосом моноцитами, причем фрагментация белка С3 и фагоцитоз стимулируются именно наличием в мембране липосом конъюгата метотрексата и не зависят от присутствия экранирующих компонентов, таких как фосфатидилинозит, ганглиозид GM₁ или пептидолипид SMG-PE. В отличие от МТХ-липосом, липосомы с пролекарством мелфалана не активируют СК (как показано в ранних тестах с кровью), что обусловлено, очевидно, локализацией остатка мелфалана на уровне полярных головных групп фосфолипидов и формированием относительно «гладкой» поверхности мембраны. Введение в качестве экранирующего компонента фосфатидилинозита позволяет получить удачную комбинацию с пролекарством мелфалана в жидкофазном бислое (на основе яичного фосфатидилхолина) и блокировать внедрение в мембрану сывороточного альбумина. Именно фосфатидилинозит был использован в базовой композиции липосом с пролекарствами мелфалана и метотрексата в экспериментах на животных. Еще большую защиту от дестабилизации белками плазмы липосом с пролекарством мелфалана создают ганглиозид GM₁ и пептидолипид SMG-PE. Неожиданным оказалось то, что введение липидного конъюгата PEG₂₀₀₀ в липосомы с жидкофазным или гелевым бислоями приводит к их разрушению в сыворотке. Этот эффект следует учитывать при использовании

PEG-липидов в составе супрамолекулярных систем доставки лекарств, нестабилизированных ковалентными связями, таких как липосомы, липидные наносферы, мицеллы.

6. Выводы

1. Липосомы с липофильным пролекарством метотрексата в бислое активируют СК по механизмам классического и альтернативного путей, что сопровождается фрагментацией центрального компонента СК СЗ.
2. МТХ-липосомы связывают и расщепляют опсонин СЗb независимо от включения в липидный бислой экранирующих молекул – фосфатидилинозита, ганглиозида GM₁ или пептидолипида SMG-PE. Опсонизация стимулирует захват МТХ-липосом моноцитами. Очевидная причина иммунореактивности – экспонирование остатка метотрексата на поверхности липосом.
3. Экранирующие компоненты по-разному влияют на стабильность липосом с липофильным пролекарством мелфалана в сыворотке крови: фосфатидилинозит защищает липидный бислой от деградации не менее 4 ч, а ганглиозид GM₁ или пептидолипид SMG-PE – не менее суток, в зависимости от концентрации в мембране.
4. Взаимодействие сывороточного альбумина с поверхностью Mph-липосом, содержащих фосфатидилинозит или ганглиозид GM₁, не влияет на структуру липидного бислоя. В отсутствие экранирующих молекул альбумин внедряется в гидрофобную часть бислоя, конформация белка при этом значительно изменяется.
5. Включение PEG-липида в жидкофазный или гелевый липидный бислой способствует диссоциации компонентов мембраны и ее разрушению. Пегилирование стабилизирует липосомы при выполнении двух условий: достаточном количестве полимера и состоянии бислоя в жидкокристаллической упорядоченной фазе.

7. Список сокращений и условных обозначений

Англоязычные сокращения и обозначения:

ABC – ускоренный вывод из кровотока (от англ. *accelerated blood clearance*)

AF4 – фракционирование в асимметричном потоке (от англ. *asymmetric flow-field-flow fractionation*)

Аро – префикс перед названием белка, образующего в комплексе с липидами (в данном случае) липопротеины

BODIPY — бор-дипиррометен (от англ. *boron-dipyrrromethene*)

BCHВ-РС — бициклогексил-BODIPY производное фосфатидилхолина

BSA — бычий сывороточный альбумин

C3 – центральный компонент системы комплемента (от англ. *complement component 3*)

C4BP – C4b-связывающий белок

CARPA – псевдоаллергические реакции гиперчувствительности (от англ. *Complement Activation-Related Pseudo-Allergy*)

Chol — холестерин

CMG-PE — конъюгат N-карбоксиметилированного олигоглицина с фосфатидилэтаноламином

DLS — динамическое лазерное светорассеяние (от англ. *dynamic light scattering*)

DMSO — диметилсульфоксид

DSPC — дистеароилфосфатидилхолин

EDTA – этилендиаминтетраацетат

EGTA – этиленгликольтетраацетат

EPR – эффект повышенной проницаемости и удерживания (от англ. *enhanced permeability and retention effect*)

ePC – фосфатидилхолин яичного желтка

FcγR – клеточные рецепторы к константной области иммуноглобулинов

FTIR — ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье (от англ. *Fourier transform infrared spectroscopy*)

FRET — Фёрстеровский резонансный перенос энергии (от англ. *Förster resonance energy transfer*)

HSA — альбумин сыворотки человека

IgG/M/E/A – иммуноглобулины класса G/M/E/A

ITC – изотермическая титрационная калориметрия (от англ. *isothermal titration calorimetry*)

LDLr – рецептор липопротеинов низкой плотности

Mlph – мелфалан

MTX – метотрексат

MlphDG – липофильное пролекарство мелфалана, 1,2-диолеоил-3-мелфаланил-*sn*-глицерин

MTXDG – липофильное пролекарство метотрексата, *rac*-1,2-диолеоилглицеро-3(β-аланил-N-карбонилметил)метотрексат

NTA — анализ траектории наночастиц (от англ. *nanoparticle tracking analysis*)

PBS – фосфатный буферный физиологический раствор

Per-MlphDG — периленоильное производное MlphDG

PEG – полиэтиленгликолил

PEG₂₀₀₀ – полиэтиленгликоль средней молекулярной массы 2000 Да

PEG-PE – дипальмитоилфосфатидилэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000]

PI – фосфатидилинозит

PMN — объединение нейтрофилов, эозинофилов и базофилов (от англ. *polymorphonuclear neutrophils*)

SR-B1 (SCARB1) – скавенджер рецептор класса В типа 1

TMB-PC — тетраметил-BODIPY производное фосфатидилхолина

Русскоязычные сокращения:

ВГ – высокогидратированный

КД – круговой дихроизм

НПВО — нарушенное полное внутреннее отражение

НЧ — наночастица

ПААГ – полиакриламидный гель

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

СК – система комплемента

ТСХ – тонкослойная хроматография

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

8. Список литературы

- [1] Gregoriadis G. and Ryman B.E. Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases // *Eur. J. Biochem.* 1972. V. 24. № 3. P. 485-491.
- [2] Gregoriadis G. Liposomes in Drug Delivery: How It All Happened // *Pharmaceutics.* 2016. V. 8. № 2. art. 19.
- [3] Л.Б. Пиотровский Очерки о наномедицине. Санкт-Петербург: «Европейский Дом», 2013. - 204 с.
- [4] Maeda H. Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond // *J. Control. Release.* 2012.V. 164. № 2. P. 138–144.
- [5] Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. № 3. P. 136–151.
- [6] Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan. W.C.W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nature Rev. Mater.* 2016. V. 1. art. 16014.
- [7] Ojha T., Pathak V., Shi Y., Hennink W.E., Moonen C.T.W., Storm G., Kiessling F. and Lammers T. Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017. V. 119. P. 44–60.
- [8] Barenholz Y. Doxil - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. № 2. P. 117–134.
- [9] Allen T. M. and Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. V. 65. № 1. P. 36–48.
- [10] Allen C. Why I'm holding onto hope for nano in oncology // *Mol. Pharm.* 2016. V. 13. P. 2603-2604.

- [11] Bulbake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. Liposomal formulations in clinical use: an updated review // *Pharmaceutics*. 2017. V. 9. art. 12.
- [12] Szebeni J., Muggia F., Gabizon A. and Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011.V. 63. P. 1020–1030.
- [13] Szebeni J., Simberg D., González-Fernández Á., Barenholz Y., Dobrovolskaia M.A. Roadmap and strategy for overcoming infusion reactions to nanomedicines // *Nat. Nanotechnol.* 2018. V. 13. P. 1100-1108.
- [14] Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. Липосомы как нано-носители липидных конъюгатов противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата // *Рос. Нанотехнологии*. 2008. Т. 3. С. 162–172.
- [15] Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovsky J., Vodovozova E. Liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan as convenient drug delivery vehicles // *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 2009. V. 19. № 1. P. 51–59.
- [16] Pedersen P.J., Christensen M.S., Ruyschaert T., Linderoth L., Andresen T.L., Melander F., Mouritsen O.G., Madsen R., Clausen M.H. Synthesis and biophysical characterization of chlorambucil anticancer ether lipid prodrugs // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. P. 3408-3415.
- [17] Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л. Усиление противоопухолевой активности сарколизина путем превращения его в липидное производное и включения в мембрану липосом, содержащих углеводный вектор // *Бюл. Эксп. Биол. Мед.* 1997. Т. 123. С. 439–441.
- [18] Vodovozova E., Moiseeva E., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLeX, in a mouse mammary adenocarcinoma model // *Eur. J. Cancer*. 2000. V. 36. P. 942–949.

- [19] Kuznetsova N.R., Stepanova E.V., Peretolchina N.M., Khochenkov D.A., Boldyrev I.A., Bovin N.V., Vodovozova E.L. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand // *J. Drug Target.* 2014. V. 22. P. 242–250.
- [20] Alekseeva A.S., Moiseeva E.V., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Singin A.S., Budko A.P., Shprakh Z.S., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L. Liposomal formulation of a methotrexate lipophilic prodrug: Assessment in tumor cells and mouse T-cell leukemic lymphoma // *Int. J. Nanomedicine.* 2017. V. 12. P. 3735–3749.
- [21] Kuznetsova N.R., Sevrin C., Lespineux D., Bovin N.V., Vodovozova E.L., Mészáros T., Szebeni J., Grandfils C. Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 394–400.
- [22] Kuznetsova N.R., Vodovozova E.L. Differential binding of plasma proteins by liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the bilayer // *Biochemistry (Mosc.)*. 2014. V. 79. № 8. P. 797–804.
- [23] Woollard K.J. Immunobiology of Monocytes and Macrophages in Inflammatory Bowel Disease. In: Baumgart D. (Eds) *Crohn's Disease and Ulcerative Colitis*. Springer, Boston, MA. 2012. P. 169-174.
- [24] Kuriakose J., Redecke V., Guy C., Zhou J., Wu R., Ippagunta S.K., Tillman H., Walker P.D., Vogel P., Häcker H. Patrolling monocytes promote the pathogenesis of early lupus-like glomerulonephritis // *J. Clin. Invest.* 2019. V. 129 № 6. P. 2251–2265.
- [25] Shi C., Pamer E.G. Monocyte recruitment during infection and inflammation // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. P. 762–774.
- [26] Moghimi S.M., Hunter A.C., Andresen T.L. Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2012. V. 52, P. 481–503.

- [27] Shah J. and Singh S. “Nanoparticle–protein corona complex: composition, kinetics, physico–chemical characterization, and impact on biomedical applications”, ch. 1 in Nanoparticle–protein corona: biophysics to biology, Kumar A. and Dhawan A., London: The Royal Society of Chemistry. 2019. – 293 p., ISBN: 978-1-78801-391-8
- [28] Gupta M.N., Roy I. How corona formation impacts nanomaterials as drug carriers // *Mol. Pharmaceutics*. 2020. V. 17. № 3. P. 725-737.
- [29] Charbgoon F., Nejabat M., Abnous K., Soltani F., Taghdisi S.M., Alibolandi M., Shier W.T., Steele T.W.J., Ramezani M. Gold nanoparticle should understand protein corona for being a clinical nanomaterial // *J. Control. Release*. 2018. V. 272. P. 39-53.
- [30] Dobrovolskaia M.A., Patri A.K., Zheng J., Clogston J.D., Ayub N., Aggarwal P., Neun B.W., Hall J.B., McNeil S.E. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles // *Nanomedicine*. 2009. V. 5. № 2. P. 106–117.
- [31] Alkilany A.M., Nalaria P.K., Hexel C.R., Shaw T.J., Murphy C.J., Wyatt M.D. Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects // *Small*. 2009. V. 5. № 6. P. 701–708.
- [32] Capriotti A.L., Caracciolo G., Cavaliere C., Foglia P., Pozzi D., Samperi R., Laganà A. Do plasma proteins distinguish between liposomes of varying charge density? // *J. Proteom*. 2012. V. 75. № 6. P. 1924–1932.
- [33] Schaller J., Gerber S., Kampfer U., Lejon S., Trachsel C. Human blood proteins: structure and function. New York: Wiley. 2008. -538p., ISBN: 978-0-470-01674-9
- [34] Fleischer C.C., Payne C.K. Secondary structure of corona proteins determines the cell surface receptors used by nanoparticles // *J. Phys. Chem. B*. 2014. V. 118. № 49. P. 14017–14026.
- [35] Gessner A., Lieske A., Paulke B., Müller R. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2002. V. 54. № 2. P. 165–170.

- [36] Kendall M., Ding P., Kendall K. Particle and nanoparticle interactions with fibrinogen: the importance of aggregation in nanotoxicology // *Nanotoxicology*. 2011. V. 5. № 1. P. 55–65.
- [37] Wolfram J., Yang Y., Shen J., Moten A., Chen C., Shen H., Ferrari M., Zhao Y. The nano-plasma interface: Implications of the protein corona // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2014. V. 124. P. 17–24.
- [38] Wolfram J., Suri K., Yang Y., Shen J., Celia C., Fresta M., Zhao Y., Shen H., Ferrari M. Shrinkage of pegylated and non-pegylated liposomes in serum // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2014. V. 124. P. 294–300.
- [39] Jamtveit B. and Meakin P. (Eds.) Growth, Dissolution and Pattern Formation in Geosystems. Dordrecht: Springer Netherlands. 1999. P. 291.
- [40] Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M.V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface // *Nat. Mater.* 2009. V. 8. № 7. P. 543–557.
- [41] Monopoli M.P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Bombelli F.B., Dawson K.A. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. № 8. P. 2525–34.
- [42] Corbo C., Molinaro R., Parodi A., Toledano Furman N.E., Salvatore F., Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery // *Nanomedicine (Lond)*. 2016. V. 11. № 1. P. 81–100.
- [43] Piella J., Bastús N.G., Puentes V. Size-dependent protein-nanoparticle interactions in citrate-stabilized gold nanoparticles: The emergence of the protein corona // *Bioconjug Chem.* 2017. V. 28. № 1. P. 88–97.
- [44] Casals E., Pfaller T., Duschl A., Oostingh G.J., Puentes V. Time evolution of the nanoparticle protein corona // *ACS Nano*. 2010. V. 4. № 7. P. 3623–3632.

- [45] Milani S., Bombelli F.B., Pitek A.S., Dawson K.A., Rädler J. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona // *ACS Nano*. 2012. V. 6. № 3. P. 2532–2541.
- [46] Pearson R.M., Juettner V.V., Hong S. Biomolecular corona on nanoparticles: a survey of recent literature and its implications in targeted drug delivery // *Front. Chem.* 2014. V. 2. P. 1–7.
- [47] Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiouptsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild K., Maskos M., Knauer S. K., Stauber R.H. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology // *Nat. Nanotechnol.* 2013. V. 8. № 10. P. 772–781.
- [48] Lilia A., Caruso G., Cavaliere C., Riccioli A., Palchetti S., Lagana A. Time evolution of nanoparticle – protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery // *Langmuir*. 2013. V. 29. P. 6485–6494.
- [49] Corbo C., Molinaro R., Taraballi F., Toledano Furman N.E., Hartman K.A., Sherman M.B., De Rosa E., Kirui D.K., Salvatore F., Tasciotti E. Unveiling the in vivo protein corona of circulating leukocyte-like carriers // *ACS Nano*. 2017. V. 11. № 3. P. 3262–3273.
- [50] Vroman L., Adams A.L., Fischer G.C., Munoz P.C. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces // *Blood*. 1980. V. 55. P. 156–159.
- [51] Vroman L. The importance of surfaces in contact phase reactions // *Semin. Thromb. Hemost.* 1987. V. 13. № 1. P. 79–85.
- [52] Göppert T.M. Müller R.H. Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting // *Int. J. Pharm.* 2005. V. 302. P. 172–186.
- [53] Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K.A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. № 38. P. 14265–14270.

- [54] Deng Z.J., Liang M., Toth I., Monteiro M., Minchin R.F. Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses // *Nanotoxicology*. 2012. V. 7. № 3. P. 1–9.
- [55] Rezaei G., Daghighi S.M., Haririan I., Yousefi I., Raoufi M., Rezaee F., Dinarvand R. Protein corona variation in nanoparticles revisited: A dynamic grouping strategy // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2019. V. 179. P. 505-516.
- [56] Docter D., Westmeier D., Markiewicz M., Stolte S., Knauer S.K., Stauber R.H. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? // *Chem. Soc. Rev.* 2015. V. 44. № 17. P. 6094–6121.
- [57] Angioletti-Uberti S., Ballauff M., Dzubiella J. Competitive adsorption of multiple proteins to nanoparticles: the Vroman effect revisited // *Mol. Phys.* 2018. V. 116. № 21-22. P. 3154-3163.
- [58] Vilaseca P., Dawson K.A., Franzese G. Understanding and modulating the competitive surface-adsorption of proteins through coarse-grained molecular dynamics simulations // *Soft Matter*. 2013. V. 9. P. 6978-6985.
- [59] Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009. V. 61. № 6. P. 428–437.
- [60] Keck C.M. and Müller R.H. Nanotoxicological classification system (NCS) - a guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. V. 84. P. 445–448.
- [61] Monopoli M.P., Aberg C., Salvati A., Dawson K.A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials // *Nat. Nanotechnol.* 2012. V. 7. P. 779–786.
- [62] Maeda H., Sawa T., Konno T. Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS // *J. Control. Release*. 2001. V. 74. P. 47–61.

- [63] Nierenberg D., Khaled A.R., Flores O. Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials // *Rep Pract Oncol Radiother.* 2018. V. 23. № 4. P. 300–308.
- [64] Colapicchioni V., Tilio M., Digiacoimo L., Gambini V., Palchetti S., Marchini C., Pozzi D., Occhipinti S., Amici A., Caracciolo G. Personalized liposome-protein corona in the blood of breast, gastric and pancreatic cancer patients // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2016. V. 75. P. 180-187.
- [65] Piloni A., Wong C.K., Chen F., Lord M., Walther A., Stenzel M.H. Surface roughness influences the protein corona formation of glycosylated nanoparticles and alter their cellular uptake // *Nanoscale.* 2019. V. 11. № 48. P. 23259–23267.
- [66] Salvati A., Pitek A., Monopoli M.P., Prapainop K., Baldelli Bombelli F., Hristov D.R., Kelly P.M., Åberg C., Mahon E., Dawson K.A. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface // *Nature Nanotech.* 2013. V. 8. P. 137–143.
- [67] Chen D., Ganesh S., Wang W., Amiji M. The role of surface chemistry in serum protein corona-mediated cellular delivery and gene silencing with lipid nanoparticles // *Nanoscale.* 2019. V. 11. № 18. P. 8760–8775.
- [68] Walkey C.D., Olsen J.B., Guo H., Emili A., Chan W.C.W. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. P. 2139–2147.
- [69] Obst K., Yealland G., Balzus B., Miceli E., Dimde M., Weise C., Eravci M., Bodmeier R., Haag R., Calderón M., Charbaji N., Hedtrich S. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: Impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity, and drug release properties // *Biomacromolecules.* 2017. V. 18. № 6. P. 1762-1771.

- [70] Guo Y., Wang L., Lv P., Zhang P. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer // *Oncol Lett.* 2015. V. 9. № 3. P. 1065–1072.
- [71] Fernández M., Javaid F., Chudasama V. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers // *Chem. Sci.* 2017. V. 9. № 4. P. 790–810.
- [72] Kabilova T.O., Shmendel E.V., Gladkikh D.V., Chernolovskaya E.L., Markov O.V., Morozova N.G., Maslov M.A., Zenkova M.A. Targeted delivery of nucleic acids into xenograft tumors mediated by novel folate-equipped liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 123. P. 59-70.
- [73] Foteini P., Pippa N., Naziris N., Demetzos C. Physicochemical study of the protein-liposome interactions: influence of liposome composition and concentration on protein binding // *J. Liposome Res.* 2019. V. 29. № 4. P. 313–321.
- [74] Li Z., Wang Y., Zhu J., Zhang Y., Zhang W., Zhou M., Luo C., Li Z., Cai B., Gui S., He Z., Sun J. Emerging well-tailored nanoparticulate delivery system based on in situ regulation of the protein corona // *J. Control. Release.* 2020. V. 320. P. 1-18.
- [75] Sharma P., Sen D., Neelakantan V., Shankar V., Jhunjhunwala S. Disparate effects of PEG or albumin based surface modification on the uptake of nano- and micro-particles // *Biomater Sci.* 2019. V. 7. № 4. P. 1411–1421.
- [76] Pozzi D., Colapicchioni V., Caracciolo G., Piovesana S., Capriotti A.L., Palchetti S., De Grossi S., Riccioli A., Amenitsch H., Laganà A. Effect of polyethyleneglycol (PEG) chain length on the bio-nano-interactions between PEGylated lipid nanoparticles and biological fluids: from nanostructure to uptake in cancer cells // *Nanoscale.* 2014. V. 6. № 5. P. 2782–2792.
- [77] Perche F. and Torchilin V.P. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting // *J. Drug Deliv.* 2013. P. 32. Article ID 705265. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/705265>. PMID: 23533772.

- [78] Moghimi S.M. and Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties // *Prog. Lipid Res.* 2003. V. 42. № 6. P. 463–478.
- [79] Schöttler S., Landfester K., Mailänder V. Controlling the stealth effect of nanocarriers through understanding the protein corona // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. № 31. P. 8806–8815.
- [80] Mohamed M., Abu Lila A.S., Shimizu T., Alaaeldin E., Hussein A., Sarhan H.A., Szebeni J., Ishida T. PEGylated liposomes: immunological responses // *Sci. Technol. Adv. Mater.* 2019. V. 20. № 1. P. 710-724.
- [81] Armstrong J.K., Hempel G., Koling S., Chan L.S., Fisher T., Meiselman H.J., Garratty G. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients // *Cancer.* 2007. V. 110. № 1. P.103-111.
- [82] Yang Q. and Lai S.K. Anti-PEG immunity: emergence, characteristics, and unaddressed questions // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2015. V. 7. № 5. P. 655–677.
- [83] Tillmann H., Ganson N.J., Patel K., Thompson A.J., Abdelmalek M., Moody T., McHutchison J.G., Hershfield M.S. High prevalence of pre-existing antibodies against polyethylene glycol (PEG) in hepatitis C (HCV) patients which is not associated with impaired response to PEG-interferon // *J. Hepatol.* 2010. V. 52. P. S129.
- [84] Mima Y., Abu Lila A.S., Shimizu T., Ukawa M., Ando H., Kurata Y., Ishida T. Ganglioside inserted into PEGylated liposome attenuates anti-PEG immunity // *J. Control. Release.* 2017. V. 250. P. 20-26.
- [85] Takeuchi T., Kitayama Y., Sasao R., Yamada T., Toh K., Matsumoto Y., Kataoka K. Molecularly imprinted nanogels acquire stealth in situ by cloaking themselves with native dysopsonic proteins // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2017. V. 56. № 25. P. 7088-7092.

- [86] Lacroix A., Edwardson T.G.W., Hancock M.A., Dore M.D., Sleiman H.F. Development of DNA nanostructures for high-affinity binding to human serum albumin // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 21. P. 7355–7362.
- [87] Caracciolo G., Pozzi D., Capriotti A.L., Cavaliere C., Piovesana S., Amenitsch H., Laganà A. Lipid composition: a “key factor” for the rational manipulation of the liposome–protein corona by liposome design // *RSC Adv.* 2015. V. 5. P. 5967–5975.
- [88] Caracciolo G. Clinically approved liposomal nanomedicines: lessons learned from the biomolecular corona // *Nanoscale.* 2018. V. 10. № 9. P.4167–4172.
- [89] Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. Non-viral vectors for gene-based therapy // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. № 8. P. 541–555.
- [90] Junquera E. and Aicart E. Recent progress in gene therapy to deliver nucleic acids with multivalent cationic vectors // *Adv Colloid Interface Sci.* 2016. V. 233. P. 161–175.
- [91] Giulimondi F., Digiaco L., Pozzi D., Palchetti S., Vulpis E., Capriotti A.L., Chiozzi R.Z., Laganà A., Amenitsch H., Masuelli L., Mahmoudi M., Screpanti I., Zingoni A., Caracciolo G. Interplay of protein corona and immune cells controls blood residency of liposomes // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. art. 3686. doi: 10.1038/s41467-019-11642-7.
- [92] Palchetti S., Caputo D., Digiaco L., Capriotti A.L., Coppola R., Pozzi D., Caracciolo G. Protein corona fingerprints of liposomes: New opportunities for targeted drug delivery and early detection in pancreatic cancer // *Pharmaceutics.* 2019. V. 11. № 1. art. 31. doi: 10.3390/pharmaceutics11010031.
- [93] Nagayama S., Ogawara K.I., Fukuoka Y., Higaki K., Kimura T. Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 342. № 1–2. P. 215–221.
- [94] Juliano R.L. and Bonte F. Interactions of liposomes with serum proteins // *Chem. Phys. Lipids.* 1986. V. 40. P. 359–372.
- [95] Tan L.A., Yu B., Sim F.C.J., Kishore U., Sim R.B. Complement activation by phospholipids: The interplay of factor H and C1q // *Protein Cell.* 2010. V. 1. № 11. P. 1033–1049.

- [96] Derksen J.T., Morselt H.W., Scherphof G.L. Uptake and processing of immunoglobulin-coated liposomes by subpopulations of rat liver macrophages // *Biochim. Biophys. Acta*. 1988. V. 971. № 2. P. 127–136.
- [97] Capriotti A.L., Caracciolo G., Caruso G., Cavaliere C., Pozzi D., Samperi R., Laganà A. Analysis of plasma protein adsorption onto DC-Chol-DOPE cationic liposomes by HPLC-CHIP coupled to a Q-TOF mass spectrometer // *Anal. Bioanal. Chem.* 2010. V. 398. № 7–8. P. 2895–2903.
- [98] van Dam A.P. and Hack C.E. Formation of C3-IgG complexes in serum by aggregated IgG and by non-immunoglobulin activators of complement // *Immunology*. 1987. V. 61. P. 105–110.
- [99] Vu V.P., Gifford G.B., Chen F., Benasutti H., Wang G., Groman E.V., Scheinman R., Saba L., Moghimi S.M., Simberg D. Immunoglobulin deposition on biomolecule corona determines complement opsonization efficiency of preclinical and clinical nanoparticles // *Nat. Nanotechnol.* 2019. V. 14. № 3. P. 260-268.
- [100] Moghimi S.M., Simberg D., Skotland T., Yaghmur A., Hunter A.C. The interplay between blood proteins, complement, and macrophages on nanomedicine performance and responses // *J Pharmacol Exp Ther.* 2019. V. 370. № 3. P. 581–592.
- [101] Bigdeli A., Palchetti S., Pozzi D., Hormozi-Nezhad M.R., Baldelli Bombelli F., Caracciolo G., Mahmoudi M. Exploring cellular interactions of liposomes using protein corona fingerprints and physicochemical properties // *ACS Nano*. 2016. V. 10. № 3. P.3723-3737.
- [102] Bally I., Inforzato A., Dalonneau F., Stravalaci M., Bottazzi B., Gaboriaud C., Thielens N.M. Interaction of C1q with pentraxin 3 and IgM revisited: Mutational studies with recombinant C1q variants // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. art. 461. doi: 10.3389/fimmu.2019.00461.
- [103] Ishida T., Ichihara M., Wang X., Yamamoto K., Kimura J., Majima E., Kiwada H. Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes // *J. Control. Release*. 2006. V. 112. № 1. P. 15–25.

- [104] Ishihara T., Takeda M., Sakamoto H., Kimoto A., Kobayashi C., Takasaki N., Yuki K., Tanaka K.I., Takenaga M., Igarashi R., Maeda T., Yamakawa N., Okamoto Y., Otsuka M., Ishida T., Kiwada H., Mizushima Y., Mizushima T. Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles // *Pharm. Res.* 2009. V. 26. № 10. P. 2270–2279.
- [105] Duque N., Gomez-Guerrero C., Egido J. Interaction of IgA with Fc α receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kB and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-Inducible Protein 10 // *J. Immunol.* 1997. V. 159. P. 3474–3482.
- [106] Hanly J.G. Antiphospholipid syndrome: An overview // *Can. Med. Assoc. J.* 2003. V. 168. № 13. P. 1675–1682.
- [107] Zipfel P.F. and Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. V. 9. № 10. P. 729–740.
- [108] Roumenina L., Bureeva S., Kantardjiev A., Karlinsky D., Andia-Pravdivy J.E., Sim R., Kaplun A., Popov M., Kishore U., Atanasov B. Complement C1q-target proteins recognition is inhibited by electric moment effectors // *J. Mol. Recognit.* 2007. V. 20. P. 405–415.
- [109] Nilsson B. and Nilsson E.K. The tick-over theory revisited: is C3 a contact-activated protein? // *Immunobiology.* 2012. V. 217. № 11. P. 1106–1110.
- [110] Sahu A. and Lambris J.D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity // *Immunol. Rev.* 2001. V. 180. P. 35–48.
- [111] Moghimi S.M. and Simberg D. Complement activation turnover on surfaces of nanoparticles // *Nano Today.* 2017. V. 15. P. 8–10.
- [112] Chen F., Wang G., Griffin J.I., Brenneman B., Banda N.K., Holers V.M., Backos D.S., Wu L., Moghimi S.M., Simberg D. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange in vivo // *Nat. Nanotechnol.* 2017. V. 12. № 4. P. 387-393.

- [113] Amara U., Rittirsch D., Flierl M., Bruckner U., Klos A., Gebhard F., Lambris J.D., Huber-Lang M. Interaction between the coagulation and complement system // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008. V. 632. P. 71-79.
- [114] Mirshafiee V., Kim R., Mahmoudi M., Kraft M.L. The importance of selecting a proper biological milieu for protein corona analysis in vitro: Human plasma versus human serum // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2016. V. 75. P.188–195.
- [115] Strother R. and Matei D. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer // *Ther. Clin. Risk. Manag.* 2009. V. 5. № 3. P. 639–650.
- [116] Szebeni J. Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals // *Mol. Immunol.* 2014. V. 61. № 2. P. 163–173.
- [117] Moghimi S.M. Nanomedicine safety in preclinical and clinical development: focus on idiosyncratic injection/infusion reactions // *Drug. Discov. Today.* 2018. V. 23. № 5. P. 1034–1042.
- [118] Ferreira V., Pangburn M., Cortés C. Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate // *Mol. Immunol.* 2010. V. 47. № 13. P. 2187–2197.
- [119] Mohlin F.C. and Blom A.M., “Purification and functional characterization of C4b-Binding Protein (C4BP),” in *The Complement System: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, M. Gajeva, Ed. New York: Humana Press, 2014, P. 169–171.
- [120] Pankov R. and Yamada K.M. Fibronectin at a glance // *J. Cell. Sci.* 2002. V. 115. P. 3861–3863.
- [121] Grinnell F. Fibronectin and wound healing // *J. Cell. Biochem.* 1984. V. 26. P. 107-116.
- [122] Price M.E., Cornelius R.M., Brash J.L. Protein adsorption to polyethylene glycol modified liposomes from fibrinogen solution and from plasma // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2001. V. 1512. № 2. P. 191–205.
- [123] Hsu M.J. and Juliano R.L. Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II: Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages // *Biochim. Biophys. Acta.* 1982. V. 720. № 4. P. 411–419.

- [124] Bern M., Sand K.M., Nilsen J., Sandlie I., Andersen J.T. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery // *J. Control. Release*. 2015. V. 211. P. 144–162.
- [125] Ernsting M.J., Murakami M., Roy A., Li S.D., Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles // *J. Control. Release*. 2013. V. 172. № 3. P. 782–794.
- [126] Jiang Y., Lu H., Khine Y.Y., Dag A., Stenzel M.H., Polyion complex micelle based on albumin-polymer conjugates: multifunctional oligonucleotide transfection vectors for anticancer chemotherapeutics // *Biomacromolecules*. 2014. V. 15. № 11. P. 4195–4205.
- [127] Gao H. and He Q., The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior // *Expert. Opin. Drug. Deliv.* 2014. V. 11. № 3. P. 409–420.
- [128] Diederichs J.E., Plasma protein adsorption patterns on liposomes: establishment of analytical procedure // *Electrophoresis*. 1996. V. 17. № 3. P. 607–611.
- [129] Sabín J., Prieto G., Ruso J.M., Messina P.V., Salgado F.J., Nogueira M., Costas M., Sarmiento F., Interactions between DMPC liposomes and the serum blood proteins HSA and IgG // *J. Phys. Chem. B*. 2009. V. 113. P. 1655–1661.
- [130] Hernández-Caselles T., Villalaín J., Gómez-Fernández J.C., Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins // *Mol. Cell. Biochem.* 1993. V. 120. № 2. P. 119–126.
- [131] Mittag J.J., Kneidl B., Preiß T., Hossann M., Winter G., Wuttke S., Engelke H., Rädler J.O., Impact of plasma protein binding on cargo release by thermosensitive liposomes probed by fluorescence correlation spectroscopy // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017. V. 119. P. 215–223.
- [132] Neagu M., Piperigkou Z., Karamanou K., Engin A.B., Docea A.O., Negrei C., Nikitovic D., Tsatsakis A. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology // *Arch. Toxicol.* 2017. V. 91. № 3. P. 1031–1048.
- [133] Kari O.K., Ndika J., Parkkila P., Louna A., Lajunen T., Puustinen A., Viitala T., Alenius H., Urtti A. In situ analysis of liposome hard and soft protein corona structure

- and composition in a single label-free workflow // *Nanoscale*. 2020. V. 12. № 3. P. 1728-1741.
- [134] de Moerloose P., Casini A., Neerman-Arbez M. Congenital fibrinogen disorders: an update // *Semin. Thromb. Hemost.* 2013. V. 39. № 6. P. 585–595.
- [135] Kyriakides T.R. “Molecular events at tissue-biomaterial interface” in Host response to biomaterials: The impact of host response on biomaterial selection, Badylak S.N. Ed. USA: Academic Press. 2015. -460 p. ISBN 9780128005002.
- [136] Su Y.C. and Riesbeck K. “Vitronectin”, ch. 33. in *The Complement FactsBook*, 2-nd edition, Barnum S. and Schein T. Academic Press. 2018. -512p. ISBN 978-0-12-810420-0.
- [137] Arcella A., Palchetti S., Digiacomio L., Pozzi D., Capriotti A.L., Frati L., Oliva M.A., Tsaouli G., Rota R., Screpanti I., Mahmoudi M., Caracciolo G. Brain targeting by liposome-biomolecular corona boosts anticancer efficacy of temozolomide in glioblastoma cells // *ACS Chem. Neurosci.* 2018. V. 9. № 12. P. 3166-3174.
- [138] Caracciolo G., Cardarelli F., Pozzi D., Salomone F., Maccari G., Bardi G., Capriotti A.L., Cavaliere C., Papi M., Laganà A. Selective targeting capability acquired with a protein corona adsorbed on the surface of 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane/DNA nanoparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2013. V. 5. № 24. P. 13171-13179.
- [139] Weis S.M. and Cheresh D.A. αV integrins in angiogenesis and cancer // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2011. V. 1. № 1. art. a006478. doi:10.1101/cshperspect.a006478
- [140] Brown M.S. and Goldstein J.L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis // *Annu. Rev. Biochem.* 1983. V. 52. P. 223–261.
- [141] Bisgaier C.L., Siebenkas M.V., Williams K.J. Effects of apolipoproteins A-IV and A-I on the uptake of phospholipid liposomes by hepatocytes // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 2. P. 862–866.
- [142] Scherphof G.L. and Kamps J.A.A.M. Receptor versus non-receptor mediated clearance of liposomes // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998. V. 32. № 1–2. P. 81–97.

- [143] Semple S.C., Chonn A., Cullis P.R. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: Relation to clearance behaviour in vivo // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998. V. 32. P. 3–17.
- [144] Vasseur S. and Guillaumond F. LDL Receptor: An open route to feed pancreatic tumor cells // *Mol. Cell. Oncol.* 2015. V. 3. № 1. art. e1033586. Doi:10.1080/23723556.2015.1033586
- [145] Papi M., Caputo D., Palmieri V., Coppola R., Palchetti S., Bugli F., Martini C., Digiacomo L., Pozzi D., Caracciolo G. Clinically approved PEGylated nanoparticles are covered by a protein corona that boosts the uptake by cancer cells // *Nanoscale.* 2017. V. 9. № 29. P. 10327-10334.
- [146] Mahley R.W., Weisgraber K.H., Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS // *J Lipid Res.* 2009. 50. (Suppl) P. S183–S188. doi:10.1194/jlr.R800069-JLR200
- [147] Yan X., Kuipers F., Havekes L.M., Havinga R., Dontje B., Poelstra K., Scherphof G.L., Kamps J.A.A.M. The role of apolipoprotein E in the elimination of liposomes from blood by hepatocytes in the mouse // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 328. № 1. P. 57–62.
- [148] Dehouck B., Fenart L., Dehouck M.P., Pierce A., Torpier G., Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: Transcytosis of LDL across the blood-brain barrier // *J. Cell Biol.* 1997. V. 138. № 4. P. 877–889.
- [149] Chen Y.C., Pohl G., Wang T.L., Morin P.J., Risberg B., Kristensen G.B., Yu A., Davidson B., Shih Ie.M. Apolipoprotein E is required for cell proliferation and survival in ovarian cancer // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 1. P. 331-337.
- [150] Li Z., Zhu J., Wang Y., Zhou M., Li D., Zheng S., Luo C., Zhang H., Zhong L., Li W., Wang J., Gui S., Cai B., Wang Y, Sun J. In situ apolipoprotein E-enriched corona guides dihydroartemisinin-decorating nanoparticles towards LDLr-mediated tumor-homing chemotherapy // *Asian J. Pharm. Sci.* 2019. Epub. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.05.002>.

- [151] Zhang Z., Guan J., Jiang Z., Yang Y., Liu J., Hua W., Mao Y., Li C., Lu W., Qian J., Zhan C. Brain-targeted drug delivery by manipulating protein corona functions // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. art. 3561. doi: 10.1038/s41467-019-11593-z.
- [152] Koltai T. Clusterin: a key player in cancer chemoresistance and its inhibition // *Oncotargets Ther.* 2014. V. 7. P. 447–456.
- [153] Wyatt A., Yerbury J., Poon S., Dabbs R., Wilson M. Chapter 6: The chaperone action of Clusterin and its putative role in quality control of extracellular protein folding // *Adv. Cancer Res.* 2009. V. 104. P. 89–114.
- [154] McDonald J.F., Nelsestuen G.L. Potent inhibition of terminal complement assembly by clusterin: characterization of its impact on C9 polymerization // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 24. P. 7464–7473.
- [155] Nienhaus K., Wang H., Nienhaus G.U. Nanoparticles for biomedical applications: exploring and exploiting molecular interactions at the nano-bio interface // *Materials Today Advances.* 2020. V. 5. art. 100036. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2019.100036>
- [156] Schöttler S., Becker G., Winzen S., Steinbach T., Mohr K., Landfester K., Mailänder V., Wurm F.R. Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers // *Nat. Nanotechnol.* 2016. V. 11. № 4. P. 372-377.
- [157] McNeil H. P., Simpson R. J., Chesterman C. N., Krilis S. A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 11. P. 4120–4124.
- [158] Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R. Beta 2 glycoprotein I is a major protein associated with very rapidly cleared liposomes in vivo, suggesting a significant role in the immune clearance of "non-self" particles // *J Biol Chem.* 1995. V. 270. № 43. P. 25845–25849. doi:10.1074/jbc.270.43.25845
- [159] Ritz S., Schöttler S., Kotman N., Baier G., Musyanovych A., Kuharev J., Landfester K., Schild H., Jahn O., Tenzer S., Mailänder V. Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake // *Biomacromolecules.* 2015. V. 16. № 4. P. 1311-1321.

- [160] Betker L., Jones D., Childs C.R., Helm K.M., Terrell K., Nagel M.A., Anchordoquy T.J. Nanoparticle uptake by circulating leukocytes: A major barrier to tumor delivery // *J. Control. Release*. 2018. V. 286. P. 85–93.
- [161] Haniffa M., Bigley V., Collin M. Human mononuclear phagocyte system reunited // *Semin Cell Dev Biol*. 2015. V. 41. P. 59–69.
- [162] А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. Иммунология. Москва: «Мир», 2000, С. 38-39.
- [163] Zbinden G., Wunderli-Allenspach H., Grimm L. Assessment of thrombogenic potential of liposomes // *Toxicology*. 1989.V. 54. P. 273–280.
- [164] Bros M., Nuhn L., Simon J., Moll L., Mailander V., Landfester K., Grabbe S. The protein corona as a confounding variable of nanoparticle-mediated targeted vaccine delivery // *Front. Immunol*. 2018. V. 9. art. 1760. doi:10.3389/fimmu.2018.01760
- [165] Wassef N.M., Alving C.R. Complement-dependent phagocytosis of liposomes // *Chem. Phys. Lipids*. 1993. V. 64. P. 239-248.
- [166] Finkelstein M.C., Kuhn S.H., Schieren H., Weissmann G., Hoffstein S. Liposome uptake by human leukocytes. Enhancement of entry mediated by human serum and aggregated immunoglobulins// *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 673. P. 286-302.
- [167] Roozendaal R. and Carroll M.C. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 673. P. 286-302.
- [168] Francian A., Mann K., Kullberg M. Complement C3-dependent uptake of targeted liposomes into human macrophages, B cells, dendritic cells, neutrophils, and MDSCs // *Int. J. Nanomed*. 2017. V. 12. P. 5149-5161.
- [169] Erdei A., Sandor N., Macsik-Valent B., Lukacsi S., Kremlitzka M., Bajtay Z. The versatile functions of complement C3-derived ligands // *Immunol. Rev*. 2016. V. 274. P. 127-140.
- [170] Scieszka J.F., Maggiora L.L., Wright S.D., Cho M.J. Role of complement C3 and C5 in the Phagocytosis of liposomes by human Neutrophils // *Pharm. Res*. 1991. V. 8. P. 65-69.
- [171] Józsi M., Schneider A.E., Kárpáti É., Sándor N. Complement factor H family proteins in their non-canonical role as modulators of cellular functions // *Semin. Cell Dev. Biol*. 2019. V. 85. P. 122–131.

- [172] Bhasym A., Bhakuni T., Guchhait P. Elevated surface-bound complement FH alters the function of platelets and monocytes in FHR1/3 null healthy individuals // *Blood Cells Mol. Dis.* 2019. V. 79. art. 102349. doi:10.1016/j.bcmed.2019.102349
- [173] Erdei A., Lukacsi S., Macsik-Valent B., Nagy-Balo Z., Kurucz I., Bajtay Z. Non-identical twins: Different faces of CR3 and CR4 in myeloid and lymphoid cells of mice and men // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019. V. 85. P. 110-121.
- [174] Moghimi S.M. and Patel H.M. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system — The concept of tissue specificity // *Adv. Drug Del. Rev.* 1998. V. 32. P. 45–60.
- [175] Afergan E., Epstein H., Dahan R., Koroukhov N., Rohekar K., Danenberg H.D., Golomb G. Delivery of serotonin to the brain by monocytes following phagocytosis of liposomes // *J. Control. Release.* 2008. V. 132. P. 84-90.
- [176] Naumenko V.A., Vlasova K.Y., Garanina A.S., Melnikov P.A., Potashnikova D.M., Vishnevskiy D.A., Vodopyanov S.S., Chekhonin V.P., Abakumov M.A., Majouga A.G. Extravasating neutrophils open vascular barrier and improve liposomes delivery to tumors // *ACS Nano.* 2019. V. 13. № 11. P. 12599-12612.
- [177] Francian A., Namen S., Stanley M., Mann K., Martinson H., Kullberg M. Intratumoral delivery of antigen with complement C3-bound liposomes reduces tumor growth in mice // *Nanomedicine.* 2019. V. 18. P. 326–335.
- [178] Palazzo C., Laloy J., Delvigne A.S., Nys G., Fillet M., Dogne J.M., Pequeux C., Foidart J.M., Evrard B., Piel G. Development of injectable liposomes and drug-in-cyclodextrin-in-liposome formulations encapsulating estetrol to prevent cerebral ischemia of premature babies // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2019. V. 127. P. 52-59.
- [179] Hernández M.R., Urbán P., Casals E., Estelrich J., Escolar G., Galán A.M. Liposomes bearing fibrinogen could potentially interfere with platelet interaction and procoagulant activity // *Int. J. Nanomedicine.* 2012. V. 7. P. 2339–2347.
- [180] Juliano R.L., Hsu M.J., Peterson D., Regen S.L., Singh A. Interactions of conventional or photopolymerised liposomes with platelets in vitro // *Exp. Cell Res.* 1983. V. 146. P. 422–427.

- [181] Koziara J.M., Oh J.J., Akers W.S., Ferraris S.P., Mumper R.J. Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles // *Pharm. Res.* 2005. V. 22. № 11. P. 1821–1828.
- [182] Constantinescu I., Levin E., Gyongyossy-Issa M. Liposomes and blood cells: a flow cytometric study // *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 2003. V. 31. № 4. P. 395–424.
- [183] Male R., Vannier W.E., Baldeschwieler J.D. Phagocytosis of liposomes by human platelets // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 19. P. 9191–9195.
- [184] Nishiya T. and Lam R.T.-T. Mechanistic study on toxicity of positively charged liposomes containing stearylamine to blood: use of carboxymethyl chitin to reduce toxicity // *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 1993. V. 1. № 4. P. 213–219.
- [185] Nishiya T. and Sloan S. Interaction of RGD liposomes with platelets // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 224. P. 242–245.
- [186] Jiskoot W., van Schie R.M., Carstens M.G., Schellekens H. Immunological risk of injectable drug delivery systems // *Pharm. Res.* 2009. V. 26. № 6. P. 1303–1314.
- [187] Fröhlich E. Action of nanoparticles on platelet activation and plasmatic coagulation // *Curr. Med. Chem.* 2016. V. 23. № 5. P. 408–430.
- [188] de la Harpe K.M., Kondiah P.P.D., Choonara Y.E., Marimuthu T., du Toit L.C., Pillay V. The hemocompatibility of nanoparticles: A review of cell-nanoparticle interactions and hemostasis // *Cells.* 2019. V. 8. № 10. art. 1209. doi:10.3390/cells8101209
- [189] Mocan T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells // *Biotechnol. Mol. Biol. Nanomed.* 2013. V. 1. № 1. P. 7–12.
- [190] Mourtas S., Michanetzis G.P., Missirlis Y.F., Antimisiaris S.G. Haemolytic activity of liposomes: effect of vesicle size, lipid concentration and polyethylene glycol-lipid or arsonolipid incorporation // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2009. V. 5. № 4. P. 409–415.
- [191] Hologati J.L., Acker J.P. Emerging role for use of liposomes in the biopreservation of red blood cells // *Transfus. Med. Hemother.* 2011. V. 38. № 2. P. 99–106.
- [192] Stoll C., Hologati J.L., Acker J.P., Wolkers W.F. Liposomes composed of unsaturated lipids for membrane modification of human erythrocytes // *Mol. Membr. Biol.* 2011. V. 28. № 7-8. P. 454–461.

- [193] Da Silveira Cavalcante L., Feng Q., Chin-Yee I., Acker J.P., Holovati J.L. Effect of liposome-treated red blood cells in an anemic rat model // *J. Liposome. Res.* 2017. V. 27. № 1. P. 56–63.
- [194] Da Silveira Cavalcante L., Acker J.P., Holovati J.L. Effect of liposome treatment on hemorheology and metabolic profile of human red blood cells during hypothermic storage // *Biopreserv. Biobank.* 2018. V. 16. № 4. P. 304–311.
- [195] Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R. Association of blood proteins with large unilamellar liposomes in vivo. Relation to circulation lifetimes // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 26. P. 18759–18765.
- [196] Digiacomio L., Palchetti S., Giulimondi F., Pozzi D., Zenezini Chiozzi R., Capriotti A.L., Laganà A., Caracciolo G. The biomolecular corona of gold nanoparticles in a controlled microfluidic environment // *Lab Chip.* 2019. V. 19. № 15. P. 2557-2567.
- [197] Crielaard B.J., Yousefi A., Schillemans J.P., Vermehren C., Buyens K., Braeckmans K., Lammers T., Storm G. An in vitro assay based on surface plasmon resonance to predict the in vivo circulation kinetics of liposomes // *J. Control. Release.* 2011. V. 156. № 3. P. 307-314.
- [198] Yatuv R., Carmel-Goren L., Dayan I., Robinson M., Baru M. Binding of proteins to PEGylated liposomes and improvement of G-CSF efficacy in mobilization of hematopoietic stem cells // *J. Control. Release.* 2009. V. 135. № 1. P. 44–50.
- [199] Weber C., Morsbach S., Landfester K. Possibilities and limitations of different separation techniques for the analysis of the protein corona // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019. V. 58. № 37. P. 12787–12794.
- [200] Docter D., Distler U., Storck W., Kuharev J., Wünsch D., Hahlbrock A., Knauer S.K., Tenzer S., Stauber R.H. Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles // *Nat. Protoc.* 2014. V. 9. № 9. P. 2030-2044.
- [201] Wasan K.M., Cassidy S.M., Ramaswamy M., Kennedy A., Strobel F.W., Ng S.P., Lee T.Y. A comparison of step-gradient and sequential density ultracentrifugation and the use of lipoprotein deficient plasma controls in determining the plasma lipoprotein distribution of lipid-associated nystatin and cyclosporine // *Pharm. Res.* 1999. V. 16. № 1. P. 165-169.

- [202] Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M., Cabaleiro-Lago C., Linse S., Dawson A. The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2007. V. 134–135. P. 167–174.
- [203] Dos Santos N., Allen C., Doppen A.M., Anantha M., Cox K., Gallagher R.C., Karlsson G., Edwards K., Kenner G., Samuels L., Webb M.S., Bally M.B. Influence of polyethylene glycol grafting density and polymer length on liposomes: relating plasma circulation lifetimes to protein binding // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1768. P. 1367–1377.
- [204] Johnstone S. A., Masin D., Mayer L., Bally M. B. Surface-associated serum proteins inhibit the uptake of phosphatidylserine and poly(ethyleneglycol) liposomes by mouse macrophages // *Biochim. Biophys. Acta -Biomembr.* 2001. V. 1513. № 1. P. 25–37.
- [205] Mikhalin A.A., Evdokimov N.M., Frolova L.V., Magedov I.V., Kornienko A., Johnston R., Rogelj S., Tartis M. S. Lipophilic prodrug conjugates allow facile and rapid synthesis of high-loading capacity liposomes without the need for post-assembly purification // *J. Liposome Res.* 2015. V. 25. № 3. P. 232–260.
- [206] Chonn A., Semple S.C., Cullis P.R. Separation of large unilamellar liposomes from blood components by a spin column procedure: towards identifying plasma proteins which mediate liposome clearance in vivo // *Biochim. Biophys. Acta.* 1991. V. 1070. P. 215–222.
- [207] Choice E., Ayyobi A.F., Pritchard P.H., Madden T.D. Separation of liposomes from plasma components using fast protein liquid chromatography // *Anal. Biochem.* 1999. V. 270. № 1. P. 1–8.
- [208] Hinna A.H., Hupfeld S., Kuntsche J., Brandl M. The use of asymmetrical flow field-flow fractionation with on-line detection in the study of drug retention within liposomal nanocarriers and drug transfer kinetics // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016. V. 124. P. 157–163.
- [209] Bria C.R. and Williams S.K. Impact of asymmetrical flow field-flow fractionation on protein aggregates stability // *J. Chromatogr. A.* 2016. V. 1465 P. 155–164.

- [210] Bantz C., Koshkina O., Lang T., Galla H.J., Kirkpatrick C.J., Stauber R.H., Maskos M. The surface properties of nanoparticles determine the agglomeration state and the size of the particles under physiological conditions // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014. V. 5. P. 1774-1786.
- [211] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
- [212] Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- [213] Winzen S., Schoettler S., Baier G., Rosenauer C., Mailaender V., Landfester K., Mohr K. Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition // *Nanoscale.* 2015. V. 7. № 7. P. 2992-3001.
- [214] Shang L., Wang Y., Jiang J., Dong S. pH-dependent protein conformational changes in albumin:gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study // *Langmuir.* 2007. V. 23. № 5. P. 2714–2721.
- [215] Deygen I.M. and Kudryashova E.V. New versatile approach for analysis of PEG content in conjugates and complexes with biomacromolecules based on FTIR spectroscopy // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2016. V 141. P. 36–43.
- [216] Barrán-Berdón A.L., Pozzi D., Caracciolo G., Capriotti A.L., Caruso G., Cavaliere C., Riccioli A., Palchetti S., Laganà A. Time evolution of nanoparticle-protein corona in human plasma: relevance for targeted drug delivery // *Langmuir.* 2013. V. 29. № 21. P. 6485-6494.
- [217] Shehata T., Ogawara K., Higaki K., Kimura T. Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers // *Int. J. Pharm.* 2008. V. 359. № 1-2. P. 272–279.
- [218] Yamazaki A., Winnik F.M., Cornelius R.M., Brash J.L. Modification of liposomes with N -substituted polyacrylamides: identification of proteins adsorbed from plasma // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1421. P. 103–115.

- [219] Chonn A., Cullis P.R., Devine D.V. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes // *J. Immunol.* 1991. V. 146. № 12. P. 4234–4241.
- [220] Schägger H. Tricine–SDS-PAGE // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. P. 16–22.
- [221] Capriotti A.L., Cavaliere C., Piovesana S. Liposome protein corona characterization as a new approach in nanomedicine // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 19. P. 4313–4326.
- [222] Vodovozova E.L., Gaenko G.P., Bobrikova E.S., Pazynina G.V., Molotkovskii Y.G. A diglyceride derivative of methotrexate: Synthesis and cytotoxic activity in addressed liposomes // *Pharm. Chem. J.* 2007. V. 41. P. 297–301.
- [223] Tretiakova D., Svirshchevskaya E., Onishchenko N., Alekseeva A., Boldyrev I., Kamyshinsky R., Natykan A., Lokhmotov A., Arantseva D., Shobolov D., Vodovozova E. Liposomal formulation of a melphalan lipophilic prodrug: studies of acute toxicity, tolerability, and antitumor efficacy // *Curr. Drug. Deliv.* 2020. V. 17: 1. 10.2174/1567201817666200214105357
- [224] Boldyrev I.A., Zhai X., Momsen M.M., Brockman H.L., Brown R.E., Molotkovsky J.G. New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes // *J. Lipid Res.* 2007. V. 48. P. 1518–1532.
- [225] Alekseeva A.S., Tretiakova D.S., Melnikova D.N., Molotkovsky Ul.G., Boldyrev I.A. Novel fluorescent membrane probe 2,3,5,6-bis(cyclohexyl)-bodipy-labeled phosphatidylcholine // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2016. V. 42. P. 305–309.
- [226] Boldyrev I.A., Grechishnikova I.V., Pavlova Yu.B., Molotkovsky Jul.G. Synthesis and properties of fluorescent-labeled triglyceride derivative of the antitumor drug melphalan // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2004. V. 30. P. 71-74.
- [227] Korchagina E., Tuzikov A., Formanovsky A., Popova I., Henryand S., Bovin N. Towards creating cell membrane glyco-landscapes with glycan lipid constructs // *Carbohydr. Res.* 2012. V. 356. P. 238–246.
- [228] Markwell M., Haas S., Bieber L. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples // *Anal. Biochem.* 1978. V. 210. P. 206–210.

- [229] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
- [230] Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels // *Anal. Chem.* 1996. V. 68. P. 850–858.
- [231] ASTM E2834-12. Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). West Conshohocken, PA, 2012.
- [232] Allen T.M., Ryan J.L., Papahadjopoulos D. Gangliosides reduce leakage of aqueous-space markers from liposomes in the presence of human plasma // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. V. 818. P. 205–210.
- [233] Shimanouchi T., Ishii H., Yoshimoto N., Umakoshi H., Kuboi R. Calcein permeation across phosphatidylcholine bilayer membrane, effects of membrane fluidity, liposome size, and immobilization // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2009. V. 73. P. 156–160.
- [234] Mourtas S., Fotopoulou S., Duraj S., Sfika V., Tsakiroglou C., Antimisiaris S.G. Liposomal drugs dispersed in hydrogels, effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics // *Colloids Surf. B: Biointerfaces*. 2007. V. 55. P. 212–221.
- [235] Maherani B., Arab-Tehrany E., Kheirilomoom A., Geny D., Linder M. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids // *Biochimie*. 2013. V. 95. P. 2018–2033.
- [236] Liu D. and Huang L. Small, but not large, unilamellar liposomes composed of dioleoylphosphatidylethanolamine and oleic acid can be stabilized by human plasma // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 7700–7707.
- [237] Klapper Y., Hamad O.A., Teramura Y., Lenewit G., Nienhaus G.U., Ricklin D., Lambris J.D., Ekdahl K.N., Nilsson B. Mediation of a non-proteolytic activation of complement component C3 by phospholipid vesicles // *Biomaterials*. 2014. V. 35. P. 3688–3696.
- [238] Des Prez R.M., Bryan C.S., Hawiger J., Colley D.G. Function of the classical and alternate pathways of human complement in serum treated with ethylene glycol tetraacetic acid and MgCl₂-ethylene glycol tetraacetic acid // *Infect. Immun.* 1975. V. 11. P. 1235–1243.

- [239] Inouye K. and Morimoto K. Preparation of F(ab')₂ mu fragments from rat IgM monoclonal antibodies and their application to the enzyme immunoassay of mouse interleukin-6 // *J. Immunol. Methods*. 1994. V. 171. P. 239–244.
- [240] Devine D.V. and Marjan J.M. The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1997. V. 14. P. 105–131.
- [241] Janssen B.J.C., Christodoulidou A., McCarthy A., Lambris J.D., Gros P. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 213–216.
- [242] Moghimi S.M., Andersen A.J., Ahmadvand D., Wibroe P.P., Andresen T.L., Hunter C. Material properties in complement activation // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. V. 63. P. 1000–1007.
- [243] Gabizon A. and Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 6949–6953.
- [244] Muller M., Zschornig O., Ohki S., Arnold K. Fusion, leakage and surface hydrophobicity of vesicles containing phosphoinositides: Influence of steric and electrostatic effects // *J. Membrane Biol.* 2003. V. 192. P. 33–43.
- [245] Allen T.M., Hansen C., Rutledge Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. V. 981. P. 27–35.
- [246] Heathcote D., Carroll T., Wang J.-J., Flower R., Rodionov I., Tuzikov A., Bovin N., Henry S. Novel antibody screening cells, MUT + Mur kodeocytes, created by attaching peptides onto red blood cells // *Transfusion*. 2010. V. 50. P. 635–641.
- [247] Karathanasis E., Geigerman C.M., Parkos C.A., Chan L., Bellamkonda R.V., Jaye D.L. Selective targeting of nanocarriers to neutrophils and monocytes // *Ann. Biomed. Eng.* 2009. V. 37. № 10. P. 1984–1992.
- [248] Münter R., Kristensen K., Pedersbæk D., Larsen J.B., Simonsen J.B., Andresen T.L. Dissociation of fluorescently labeled lipids from liposomes in biological environments challenges the interpretation of uptake studies // *Nanoscale*. 2018. V. 10. № 48. P. 22720–22724.

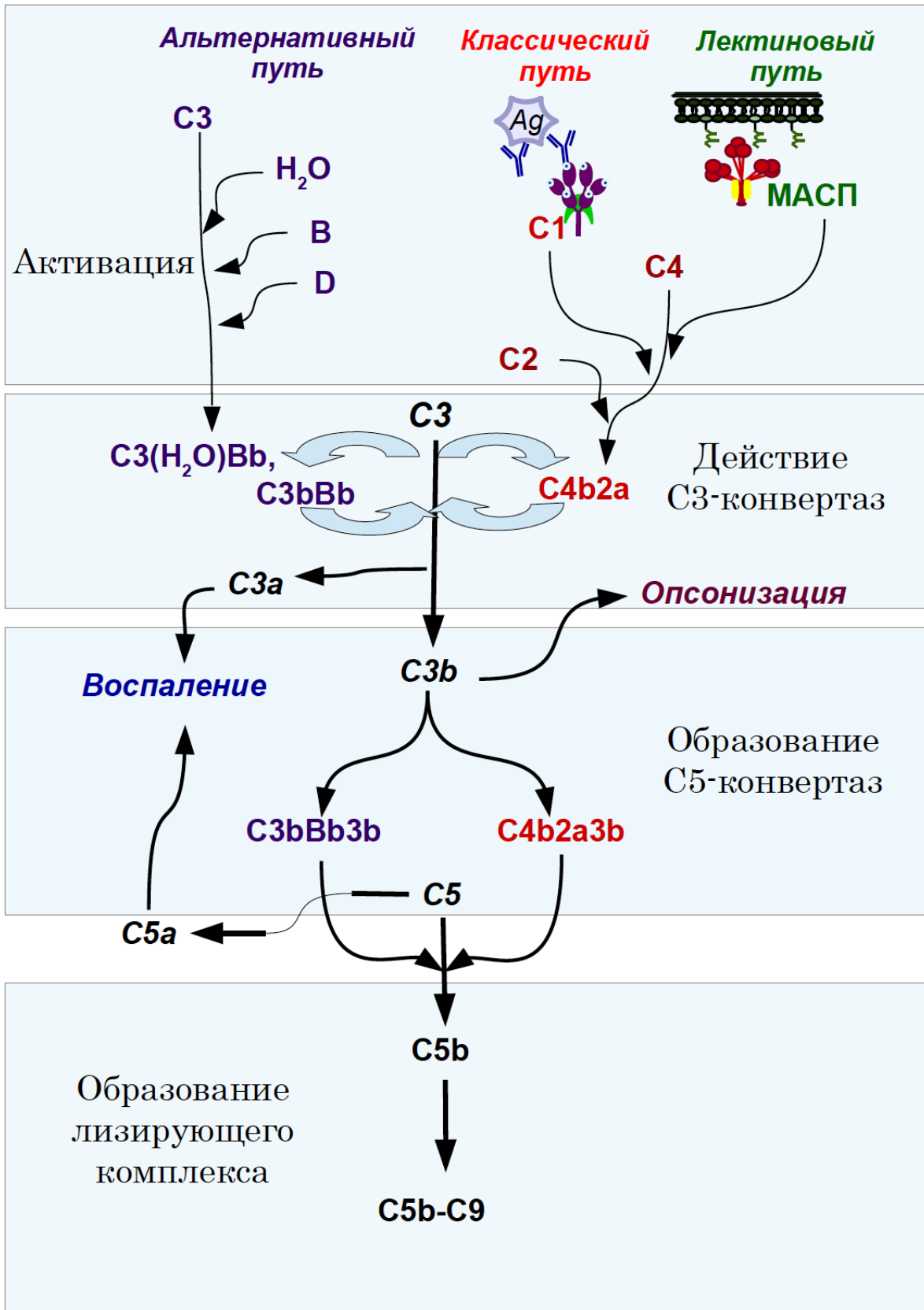
- [249] Bisso P.W., Gaglione S., Guimarães P.P.G., Mitchell M.J., Langer R. Nanomaterial interactions with human neutrophils // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2018. V. 4. № 12. P. 4255–4265.
- [250] Hed J. The extinction of fluorescence by crystal violet and its use to differentiate between attached and ingested microorganisms in phagocytosis // *FEMS Lett.* 1977. V. 1. P. 357–361.
- [251] Betker J.L., Jones D., Childs C.R., Helm K.M., Terrell K., Nagel M.A., Anchordoquy T.J. Nanoparticle uptake by circulating leukocytes: A major barrier to tumor delivery // *J. Control. Release.* 2018. V. 286. P. 85–93.
- [252] Alekseeva A.S., Tretiakova D.S., Chernikov V.P., Utkin Y.N., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L., Boldyrev I.A. Heterodimeric V. nikolskii phospholipases A2 induce aggregation of the lipid bilayer // *Toxicon.* 2017. V. 133. P. 169-179.
- [253] Tatulian S.A. “Structural Characterization of Membrane Proteins and Peptides by FTIR and ATR-FTIR Spectroscopy” in *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Jörg H. Kleinschmidt (Ed), Totowa: Humana Pres. 2013. P. 177–216. ISBN-13: 978-1627032742.
- [254] Tatulian S.A. Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy: a method of choice for studying membrane proteins and lipids // *Biochemistry.* 2003. V. 42. № 41. P. 11898–11907.
- [255] Pentak D., Kozik V., Bąk A., Dybał P., Sochanik A., Jampilek J. Methotrexate and cytarabine-loaded nanocarriers for multidrug cancer therapy. Spectroscopic study // *Molecules.* 2016. V. 21. № 12. art. 1689. doi:10.3390/molecules21121689
- [256] Shafaa M.W. Interaction of bisoprolol or enalapril with distearoyl phosphatidylcholine liposomes. FTIR and DSC studies // *Romanian J. Biophys.* 2018. V. 28. № 3. P. 103–114.
- [257] Blume A., Hübner W., Messner G. Fourier transform infrared spectroscopy of ¹³C = O-labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups // *Biochemistry.* 1988. V. 27. № 21. P. 8239–8249.

- [258] Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S. Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy // *Nat. Protoc.* 2015. V. 10. № 3. P. 382–396.
- [259] Mantsch H.H., McElhaney R.N. Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy // *Chem. Phys. Lipids.* 1991. V. 57. № 2-3. P. 213–226.
- [260] Lewis R.N., McElhaney R.N. Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase behavior of a homologous series of n-saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamines // *Biophys. J.* 1993. V. 64. № 4. P. 1081–1096.
- [261] Gong J, Yao P, Duan H, Jiang M, Gu S, Chunyu L. Structural transformation of cytochrome c and apo cytochrome c induced by sulfonated polystyrene // *Biomacromolecules.* 2003. V. 4. № 5. P. 1293–1300.
- [262] Gagner J.E., Lopez M.D., Dordick J.S., Siegel R.W. Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 29. P. 7241–7252.
- [263] Woodle M.C. and Lasic D.D. Sterically stabilized liposomes // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1113. P. 171-199.
- [264] Silvius J.R. and Zuckermann M.J. Interbilayer transfer of phospholipid-anchored macromolecules via monomer diffusion // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 3153–3161.
- [265] Parr M.J., Ansell S.M., Choi L.S., Cullis P.R. Factors influencing the retention and chemical stability of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates incorporated into large unilamellar vesicles // *Biochim. Biophys. Acta.* 1994. V. 1195. P. 21–30.
- [266] Li W.M., Xue L., Mayer L.D., Bally M.B. Intermembrane transfer of polyethylene glycol-modified phosphatidylethanolamine as a means to reveal surface-associated binding ligands on liposomes // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1513. P. 193–206.

- [267] Chiu G.N.C., Bally M.B., Mayer L.D. Effects of phosphatidylserine on membrane incorporation and surface protection properties of exchangeable poly(ethylene glycol)-conjugated lipids // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. V. 1560. P. 37-50.
- [268] Garbuzenko O., Barenholz Y., Prieв A. Effect of grafted PEG on liposome size and on compressibility and packing of lipid bilayer // *Chem. Phys. Lipids*. 2005. V. 135. P. 117–129.
- [269] Mouristen O.G. and Jorgenson K. Dynamic order and disorder in lipid bilayers // *Chem. Phys. Lipids*. 1994. V. 73. P. 3–25.
- [270] Prieв A., Samuni A., Tirosh O., Barenholz Y. “The role of hydration instabilization of liposomes: resistance to oxidative damage of PEG-grafted liposomes”, in *Targeting of Drugs 6: Strategies for Stealth Therapeutic Systems*, G. Gregoriadis, B. McCormack (Eds.), New York: Plenum Press. 1998. P.147–167.

9. Приложения

Приложение 1. Каскад реакций системы комплемента



Классический путь активации системы комплемента относят к приобретенному иммунитету. При попадании в организм чужеродного антигена образуется его комплекс с антителами IgG или IgM. Данные комплексы распознаются белком C1 системы комплемента. Одна из частей данного белка C1q, отвечает за высокоаффинное связывание с константной областью иммуноглобулинов, для которого необходимо присутствие ионов Ca^{2+} . Тогда многоточечное взаимодействие вызывает изменение конформации в данном белке, что запускает автокаталитическую реакцию, в результате которой происходит активация другой субъединицы белка C1s, проявляющей эстеразную активность. Данная сериновая эстераза участвует в расщеплении следующего белка – C4 до его фрагментов C4a и C4b*, первый из которых является анафилотоксином, а второй быстро образует связи с гидрокси- и аминогруппами поверхностей мембран вследствие своей нестабильности. Связанный с поверхностью белок C4b вступает во взаимодействие с проферментом C2, который также является субстратом C1s. После действия данной эстеразы (в присутствии ионов магния) образуется C3-конвертаза общая для классического и лектинового путей C4b2a.

Считается, что лектиновый путь активации системы комплемента реализуется в присутствии бактерий, тем не менее, существуют и исключения, когда маннан-связывающий лектин взаимодействует с небактериальными поверхностями. Для данного пути характерно взаимодействие маннан-связывающего лектина с концевыми группами маннозы на поверхности клеточной стенки бактерий. Роль белка C1 в данном случае играют гомологичные по структуре маннан-связывающие лектин-ассоциированные сериновые протеазы (МАСП). Дальнейшее развитие каскада происходит по классическому пути.

Альтернативный путь активации представляет собой механизм неспецифического врожденного иммунитета. В плазме крови постоянно поддерживается небольшая концентрация C3b, образующегося в ходе «холостой активации», так как внутренняя тиоэфирная связь в нативной молекуле белка C3 чувствительна к спонтанному гидролизу с превращением в активированную

форму. Образующийся белок связывает фактор В, в присутствии ионов магния, с образованием С3-конвертазы альтернативного пути (С3bBb). При действии данной конвертазы в жидкой фазе большая часть образованного белка С3b* инактивируется в ходе гидролиза. Однако в случае контакта с чужеродной поверхностью индуцируется действие петли усиления. Петлей усиления называется явление дополнительного образования новых молекул С3b, вызываемое связыванием первично образованных молекул С3b с какой-либо поверхностью. Петля усиления функционирует и в случае связывания С3b с поверхностью при классическом пути активации.

Мембраны собственных клеток организма защищены от повышенного отложения С3b благодаря сиаловой кислоте и регуляторным белкам организма-хозяина, связанных с поверхностью.

Для быстрого накопления опсонина С3b необходимо образование мембраносвязанной С3-конвертазы. Амплификация приводит к фиксации множества молекул данного белка в одном месте. Также фрагмент С3b, связываясь с С3-конвертазой, образует С5-конвертазу. Белок С5 избирательно связывается с С3b в составе новой конвертазы – трехмолекулярного комплекса. При расщеплении С5 образуется небольшой пептидный фрагмент – высокоактивный анафилотоксин (С5a).

Последующее образование лизирующего мембрану комплекса (С5b - 9) происходит без участия ферментов. Компонент С5b последовательно связывает белки С6 и С7, образуя гидрофобный комплекс, способный встраиваться в липидный бислой. К указанному комплексу присоединяются белок С8, после чего появляется некоторая литическая активность, и несколько мономеров С9, полимеризация которых приводит к итоговому развитию лизиса.

Приложение 2. Схема расщепления компонента C3

