

Рисунок 2 – Соотношение между содержанием внутриклеточного АТФ (пикомоль/мг) и специфической активностью (КОЕ, млн/мг) для образцов лиофилизованной БЦЖ вакцины, реконструированной в физрастворе

Следует подчеркнуть, что высокий коэффициент корреляции достигнут, в частности, благодаря использованию стандартного набора реагентов, не требующих дополнительных манипуляций. Это позволило снизить трудоемкость аналитических процедур и себестоимость анализа, что особенно важно при использовании данного метода в условиях производства лиофилизованных БЦЖ вакцин.

Список литературы / References:

1. Lomakina G.Yu., Modestova Yu.A., Ugarova N.N. Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, pp. 701-713.
2. Janaszek W., Aleksandrowicz J., Sitkiewicz D. The use of the firefly bioluminescent reaction for the rapid detection and counting of mycobacterium BCG. *J. Biol. Stand.*, 1987, vol. 15, pp. 11-16.
3. Jensen S.E., Hubrechts P., Klein B.M., Haslow K.R. Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilized BCG Danish 1331 vaccine. *Biologicals*, 2008, vol. 36, pp. 308-314.
4. Ho M.M., Markey K., Rigsby P., Jensen S.E., Gairola S., Seki M., Castello-Branco L.R., Lopez-Vidal Y., Knezevic I., Corbel M.J. Report of an international collaborative study to establish the suitability of using modified ATP assay for viable count of BCG vaccine. *Vaccine*, 2008, vol. 26, pp. 4754-4757.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ АМФИФИЛЬНЫХ ПОЛИПЕПТИДОВ

Влах Е.Г.¹, Зашихина Н.Н.², Тенникова Т.Б.¹

¹Институт химии, Санкт-Петербургский государственный университет
Университетский пр., 26, Петергоф, г. Санкт-Петербург, 198504, РФ

²Институт высокомолекулярных соединений, Российская академия наук
Большой пр., 31, В.О., г. Санкт-Петербург, 199004, РФ
e-mail: vlakh@mail.ru

Аннотация. Разработка полимерных носителей для адресной доставки цитостатических препаратов, используемых для терапии онкологических заболеваний, направлена на преодоление побочных отрицательных свойств подобных лекарств таких, например, как высокая токсичность, отсутствие селективности и низкая биодоступность. Одним из перспективных типов биodeградируемых частиц для создания систем доставки лекарств являются частицы, полученные на основе амфифильных полипептидов. К преимуществам данных полимеров можно отнести их высокую биосовместимость, способность к биodeградации и самоорганизации. В представляемой работе обсуждаются результаты по синтезу амфифильных полипептидов на основе α -L-аминокислот; получению наночастиц на их основе; изучению цитотоксичности, стабильности и способности к клеточной трансфекции полученных наночастиц; а также получению инкапсулированных форм цитостатических препаратов, используемых для терапии колоректального рака (иринотекан и 5-фторурацил).

Ключевые слова: амфифильные полипептиды, биodeградируемые частицы, системы доставки лекарств, противораковые препараты.

PERSPECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEMS BASED ON AMPHIPHILIC POLYPEPTIDES

Vlakh E.G.¹, Zashikhina N.N.², Tennikova T.B.¹¹Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University*Universitetskii av., 26, Peterhoff, St. Petersburg, 198504, Russia*²Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences*Bolshoy pr. 31, V.I., St. Petersburg, 199004, Russia**e-mail: vlakh@mail.ru*

Abstract. The development of polymeric carriers for delivery of antitumor drugs used for the cancer therapy, is aimed to overcome such negative properties of these drugs, as high toxicity, lack of selectivity and low bioavailability. The amphiphilic polypeptides represent the promising type of polymer to create drug delivery systems. The advantages of these polymers are related to their high biocompatibility, ability to biodegradation and self-assembly. In this work, the results on the synthesis of amphiphilic polypeptides based on α -L-amino acids, the preparation of nanoparticles based on them, the cytotoxicity study, the stability and ability of obtained nanoparticles to cell transfection, as well as the production of encapsulated forms of cytotoxic drugs used for the treatment of colorectal cancer (irinotecan and 5-fluoruracil) are discussed.

Key words: amphiphilic polypeptides, biodegradable particles, drug delivery systems, anti-cancer drugs.

В настоящее время заболеваемость колоректальным раком (КРР) занимает третье место среди всех злокачественных новообразований, регистрируемых по всему миру [1]. Помимо высокой заболеваемости КРР характеризуется высокой смертностью. Одной из причин низкой выживаемости является неудовлетворительный уровень химиотерапевтического лечения. В первую очередь это связано, с тем, что цитостатические агенты не избирательны, мишенью для них может быть любая делящаяся клетка в стадии митоза, а доля пролиферативных опухолевых клеток в солидных опухолях не высока. Кроме того, сосудистое русло опухоли сформировано хаотично, что также затрудняет поставку цитостатика. Одним из путей повышения эффективности химиотерапевтического лечения является использование инкапсулированных форм лекарственных препаратов.

В последнее десятилетие наблюдается возрастающий интерес к созданию полимерных наночастиц различного типа, а именно, наносфер, микрокапсул, полимеросом, что обусловлено широкими возможностями их применения в медицинской практике: адресная доставка лекарственных препаратов, увеличение транспорта лекарственных веществ через биологические барьеры и биовизуализация. Ключевым требованием к полимерным биоматериалам является их биосовместимость и способность к биodeградации. Из ряда существующих биodeградируемых полимеров синтетические полипептиды представляют собой один из наиболее интересных классов макромолекул. Наличие у полиаминокислот собственных реакционных групп в боковой цепи позволит модифицировать поверхность наночастиц различными лигандами, обеспечивающими направленный транспорт. Кроме того, благодаря наличию вторичной структуры, многие полипептиды обладают собственной биологической активностью, что, безусловно, может также оказаться полезным для решения задач, связанных с созданием лекарственных систем [2].

В данной работе для получения инкапсулированных форм специфических к КРР препаратов, а именно иринотекана и 5-фторурацила, были использованы амфифильные полипептиды, состоящие из гидрофильного и гидрофобного блоков, а именно поли(глутаминовая кислота)-полифенилаланин, полилизин-полифенилаланин, поли(глутаминовая кислота)-полилейцин и полилизин-полилейцин. Данные полипептиды были получены методом полимеризации N-карбоксииангидридов α -L-аминокислот (полимеризация с раскрытием цикла) [3].

Синтез полипептидов осуществлялся в две стадии (см. рис. 1). На первой стадии получали гомополимер полилизина или поли(глутаминовой кислоты), содержащий защитные группы в боковой цепи. В частности, использовали карбоксибензильную группу для защиты ϵ -аминогруппы лизина и бензильную - для защиты γ -карбоксила глутаминовой кислоты. В качестве инициатора для полимеризации N-карбоксииангидридов был выбран гексилламин. На второй стадии осуществляли синтез блок-сополимера. На данном этапе в качестве иницирующей группы использовали концевую аминогруппу, синтезированного ранее гомополимера (макроинициатор). После завершения синтеза боковые защитные группы удаляли и полипептид приобретал амфифильные свойства. Все полученные сополимеры были охарактеризованы методом гельпроникающей хроматографии и аминокислотного анализа.

Получение частиц синтезированных амфифильных полипептидов проводили методом инверсии фаз с органической на водную. Изучение морфологии частиц методом просвечивающей электронной микроскопии (см. рис. 2) позволило установить, что полученные частицы представляли собой объекты двух типов, а именно полимеросомы и мицеллы. Морфология получаемых частиц зависела от природы блок-полипептида и соотношения гидрофильного и гидрофобного блоков.

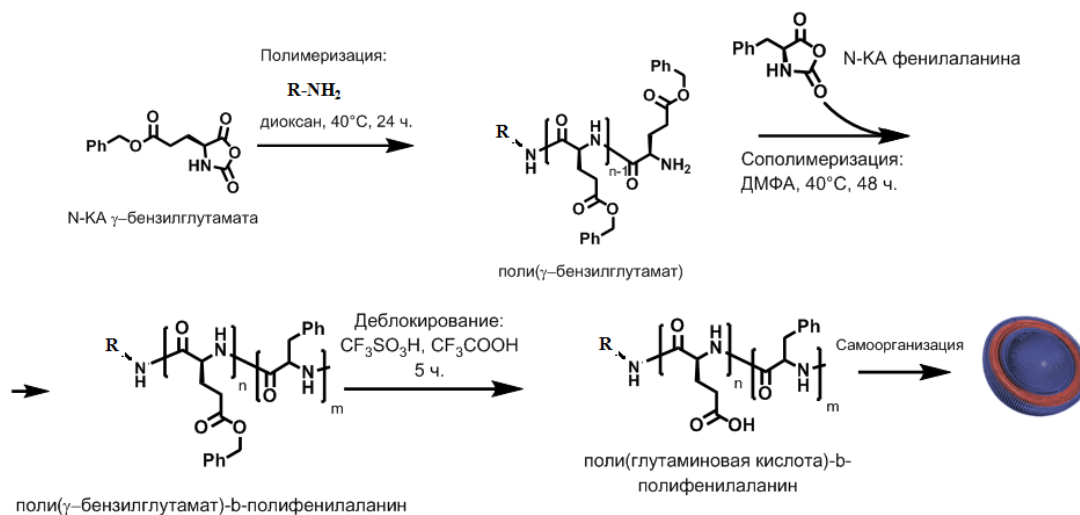


Рисунок 1 – Схема синтеза амфифильных полипептидов для последующего получения частиц

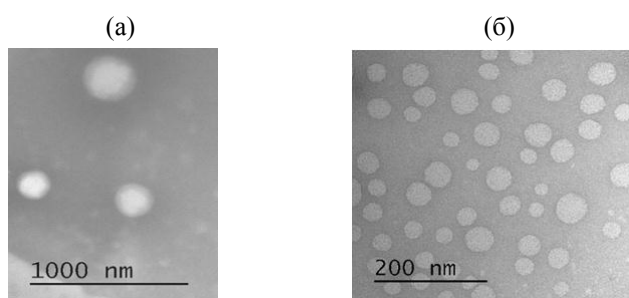


Рисунок 2 – Микрофотографии образцов частиц на основе полилизина-*b*-полифенилаланина (а) и поли(глутаминовой кислоты)-*b*-полифенилаланина (б)

Средний размер частиц и индекс полидисперсности оценивали методом динамического светорассеяния. Установлено, что в зависимости от состава сополимера, а также условий проведения самоорганизации средний размер получаемых частиц лежал в диапазоне от 40 до 2500 нм, а индекс полидисперсности от 0.05 до 0.30. Частицы, на основе поли(глутаминовой кислоты) и полилизина характеризовались наличием правильного знака ξ -потенциала и достаточно высокими значениями данного параметра по модулю. В частности, для частиц на основе сополимеров глутаминовой кислоты величина ξ -потенциала в воде лежала в диапазоне от -50 до -70 мВ, а для частиц на основе полилизина – в диапазоне от $+40$ до $+60$ мВ (см. рис. 3а). Считается, что коллоидная система является стабильной, если значения ξ -потенциала по модулю превышают 30 мВ [4]. Действительно, эксперименты по изучению стабильности полученных частиц в течение двух недель показали, что системы с размером меньше 700 нм характеризовались высокой антиагрегационной устойчивостью, что выразалось в сохранении индивидуальных размеров частиц (см. рис. 3б).

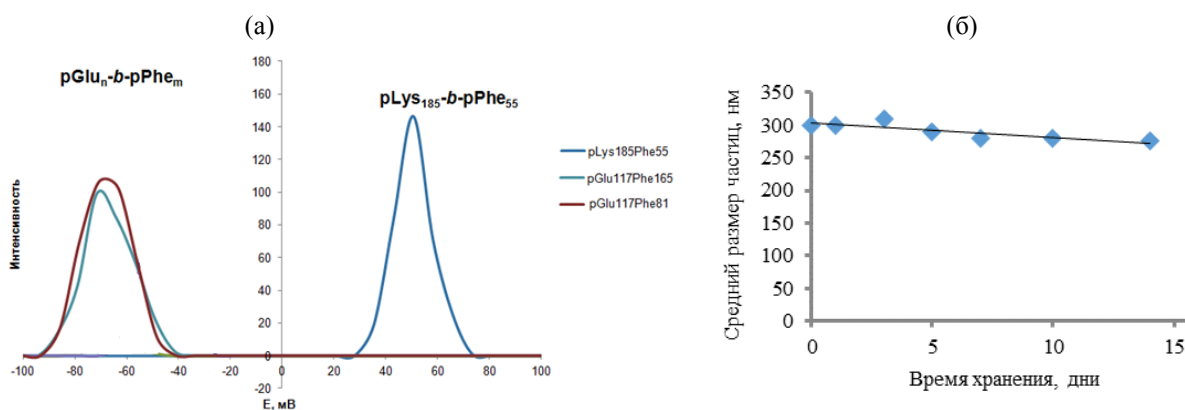


Рисунок 3 – ξ -потенциал (а) и зависимость среднего размера частиц от времени хранения коллоидной системы (динамическое светорассеяние) (б)

Цитотоксичность полученных частиц на основе полипептидов исследована с использованием МТТ-теста на клетках фибробластах мыши (NIH 3Т3), эмбриональных клетках почек человека (HEK 293) и клетках карциномы легкого человека (A549). Инкубирование частиц с различной концентрацией в культурах клеток в течение 72 часов не способствовало гибели клеток. В частности, уровень выживаемости клеток во всех случаях составлял 85-100 % (см. рис. 4).

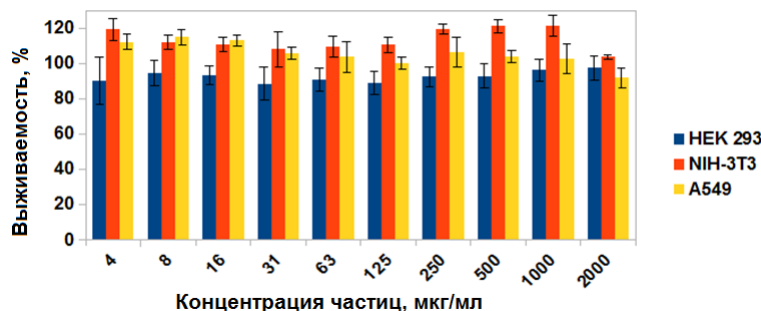


Рисунок 4 – МТТ-тест на выживаемость различных клеток в течение 72 часов в присутствии частиц на основе поли(глутаминовой кислоты)-b-полифенилаланина.

Известно, что векторами для адресной доставки часто являются белки и пептиды. В связи с этим в представляемой работе был разработан метод модификации поверхности частиц белками. В качестве модельного белка был выбран фермент рибонуклеаза А. Сравнение активности нативного и иммобилизованного фермента в реакции гидролиза специфического низкомолекулярного субстрата цитидин-2',3'-циклофосфата показало, что иммобилизация фермента не приводила к уменьшению его удельной активности по сравнению с активностью нативной формы биокатализатора. Это означает, что выбранный метод модификации полипептидных наночастиц может быть использован в дальнейшем для введения в структуру поверхности специфических лигандов, ответственных за адресную доставку лекарств.

Возможность трансфекции частиц в клетки аденокарциномы толстой кишки человека (Caco-2) была доказана с использованием метода флуоресцентной микроскопии. Для этого в полученные частицы вводили флуоресцентные красители флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ) и родамин 6g. В первом случае метка ковалентно закреплялась на поверхности частиц, а во втором - инкапсулировалась внутри них. Схемы получения меченных частиц и микрофотографии клеток до трансфекции (оптическая микроскопия) и после трансфекции частиц внутрь клеток (флуоресцентная микроскопия) представлены на рисунке 5. Равномерное окрашивание клеток свидетельствует о проникновении частиц внутрь клеток вследствие неспецифического эндоцитоза.

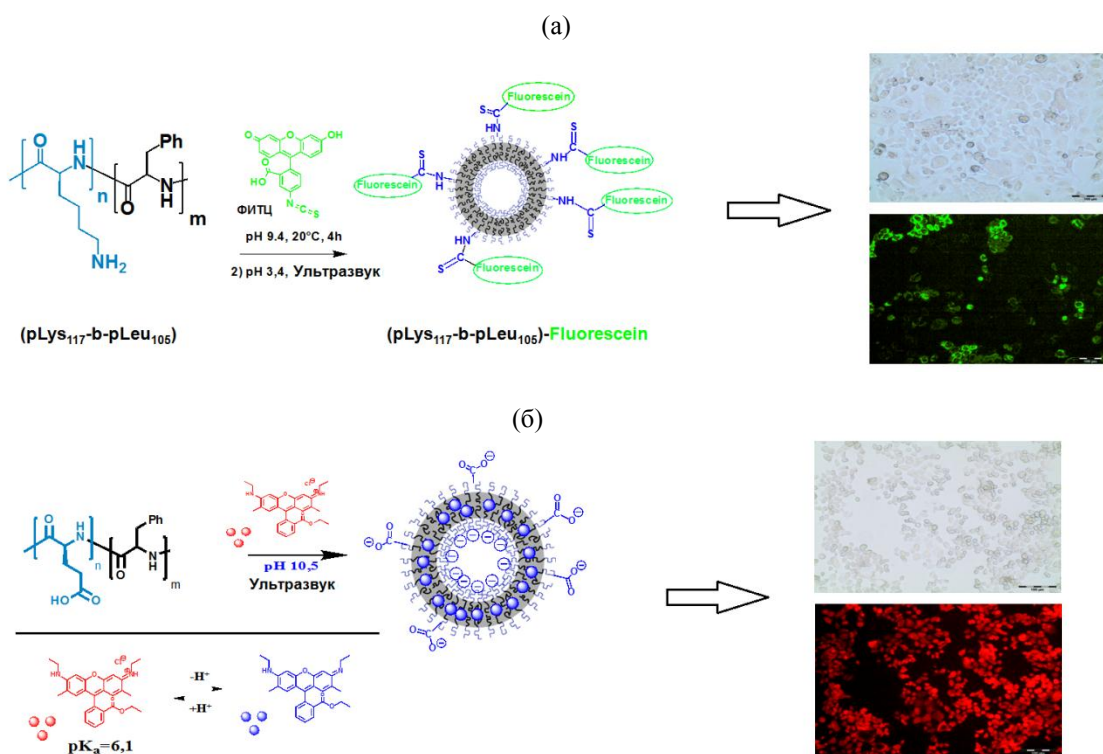


Рисунок 5 – Введение флуоресцентных меток в полипептидные частицы и визуализация распределения красителя после трансфекции частиц внутрь клеток Caco-2: (а) ФИТЦ, (б) родамин 6 g

Изучение возможности получения инкапсулированных форм иринотекана в полипептидные частицы показало, что максимальная эффективность инкапсулирования составляет 20 % или 350 мкг/мг частиц. Полученные инкапсулированные системы характеризовались отсутствием самопроизвольного высвобождения вещества, а значит стабильностью, в течение срока наблюдения (45 дней). Изучение кинетики высвобождения лекарственного вещества *in vitro* в плазме крови человека показало, что полное высвобождение иринотекана протекало в течение 4-5 суток и связано с частичной деградацией полипептидной частицы под действием ферментов плазмы крови.

В предварительных экспериментах по инкапсулированию 5-фторурацила показано, что данный цитостатик также включается в исследуемые частицы.

На основании результатов, полученных в ходе выполнения данной работы, можно заключить, что частицы на основе амфифильных полипептидов являются перспективными средствами для адресной доставки лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-50-00069). Исследования проведены с использованием приборной базы ресурсных центров СПбГУ: "Методы анализа состава вещества" и "Развитие молекулярных и клеточных технологий".

Список литературы / References:

1. Laweus D., Taylor I. Chemotherapy for colorectal cancer – an overview of current managements for surgeons. *EJSO*, 2005, vol. 31, pp. 932-941.
2. Deming T.J., Synthetic polypeptides for biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2007, vol. 32, pp. 858-875.
3. Cheng J., Deming T.J. Synthesis of polypeptides by ring-opening polymerization of α -amino acid N-carboxyanhydrides. *Top Curr. Chem.*, 2012, vol. 310, pp. 1-26.
4. Prokop A., Iwasaki Y., Harada A. (Eds.) Intracellular delivery II: Fundamentals and Applications. *Springer, Heidelberg*, 2014, 479 p.

МОРФОЛОГИЯ И ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ КАРРАГИНАН:ХИТОЗАН

Володько А.В.¹, Давыдова В.Н.¹, Чусовитин Е.А.², Ермак И.М.¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Просп. 100-летия Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

² Институт автоматизации и процессов управления
ул. Радио, 5, г. Владивосток, 690041, РФ

Аннотация. Получены полиэлектролитные комплексы (ПЭК) каррагинан:хитозан и изучено влияние соотношения исходных компонентов на их формирование методами динамического рассеяния света (ДРС), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и электрокинетических измерений. Показано, что механизм образования ПЭК определяется полимером, находящимся в избытке. При избытке в системе поликатиона – хитозана формируются положительно заряженные частицы ПЭК стабилизированные аминогруппами, которые определяют положительный заряд комплекса (среднее значение ζ -потенциала 40 мВ). Согласно данным АСМ хитозан локализуется на поверхности фибрилл каррагинана. В комплексах с преобладанием каррагинана при увеличении содержания хитозана уменьшается количество несвязанных сульфатных групп, что приводит к снижению отрицательного поверхностного заряда частиц (с -92,4 до -55,6 мВ). Исследование ПЭК методом АСМ показало, что в данном случае хитозан встраивается в сетчатую структуру каррагинана, а при соотношении каррагинан:хитозан 1:0,5 в/в разрывает ее, что согласуется с изменением поверхностного заряда и размеров комплексов.

Ключевые слова: полиэлектролитный комплекс, каррагинан, хитозан, атомно-силовая микроскопия, ζ -потенциал.