

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ФОСФОЛИПИДНАЯ СИСТЕМА С АДРЕСНЫМ ПЕПТИДОМ АНГИОПЕП-2 ДЛЯ ДОСТАВКИ ХЛОРИНА Е6 В ИССЛЕДОВАНИИ *IN VITRO*

Ю.А. Терешкина\*, Л.В. Кострюкова, А.М. Пятигорский, Е.Г. Тихонова

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121 Москва, Погодинская ул., 10; \* e-mail: burova13@gmail.com

Полученная ранее фосфолипидная наносистема для доставки фотосенсибилизатора хлорина е6 была модифицирована нацеливающим лигандом – олигопептидом ангиопеп-2, обладающим высокой способностью к трансцитозу через гематоэнцефалический барьер. Данное свойство ангиопеп-2 особенно актуально для направленной доставки терапевтических и диагностических агентов в патологические (опухолевые) очаги мозга. Согласно проведенному анализу физико-химических параметров разработанной композиции, размер частиц составил  $31.98 \pm 1.98$  нм (PDI  $0.453 \pm 0.03$ ), значение  $\zeta$ -потенциала соответствовало  $-27.43 \pm 1.14$  мВт; при этом субстанция практически полностью ( $98.6 \pm 0.43\%$ ) была встроена в наночастицы. В эксперименте *in vitro* было показано увеличение общего накопления и интернализации хлорина е6 на клеточной линии глиобластомы человека U-87 MG в варианте с содержащей адресный пептид фосфолипидной формой по сравнению со свободной субстанцией на 33% и 40% соответственно. Исследование цитотоксического действия без облучения не выявило различий между образцами в диапазоне концентраций от 0.125 мкг/мл до 2.5 мкг/мл (по хлорину е6). Изучение фотоиндуцированной активности (доза облучения 1.5 Дж/см<sup>2</sup>) показало, что значение IC<sub>50</sub> для полученной композиции было ниже в 1.33 раза по сравнению со свободной субстанцией и составило  $2.85 \pm 0.1$  мкг/мл. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о перспективности разработанной композиции и целесообразности её дальнейшего исследования *in vitro* и *in vivo*.

**Ключевые слова:** ангиопеп-2; фосфолипидные наночастицы; хлорин е6

DOI: 10.18097/BMCRM00244

## ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее агрессивных типов опухолей головного мозга является глиобластома (ГБМ), характеризующаяся инфильтративностью с микроскопическим распространением на нормальную паренхиму головного мозга [1]. При терапии ГБМ после хирургического вмешательства в большинстве случаев от края видимой области опухолевой массы обнаруживаются микроскопические инфильтрующие клетки [2], поэтому дополнительно проводят химио- и лучевую терапию, в том числе возможно применение фотодинамической терапии (ФДТ). Принцип ФДТ основан на введении специфического агента – фотосенсибилизатора (ФС), селективно накапливающегося в опухоли и под воздействием лазерного облучения приводящего к гибели раковых клеток. Использование ФДТ возможно непосредственно во время удаления опухоли для подсвечивания ее границ при флуоресцентном контроле или сразу после резекции опухоли. Данные манипуляции позволяют максимально убрать скрытые и резидуальные клетки, тем самым снижая риск рецидивов ГБМ [3-5]. Наиболее часто используемыми ФС для лечения злокачественных новообразований головного мозга являются 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) и фотофрин (PHOTOFRIN®) [6, 7]. Проведен ряд исследований по использованию хлорина е6 (Се6) в терапии злокачественных новообразований головного мозга; Се6 обладает повышенной фотоактивацией при более длинных волнах (660-670 нм) и сниженной «темновой» токсичностью по сравнению с производными гематопорфирина [8-11]. В

клинических исследованиях была показана эффективность использования Се6 в ФДТ при терапии различных типов опухолей [12-14].

Использование ФДТ хотя и является перспективным методом лечения ГБМ, однако препараты ФС, используемые при данном методе, в большинстве случаев не обладают достаточной специфичностью к ГБМ вследствие ограниченного проникновения через защитный гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). При введении лекарственных препаратов ГЭБ ограничивает их поступление к опухоли головного мозга (ГБМ) (более 98% низкомолекулярных и почти 100% высокомолекулярных соединений) [15]. Для преодоления данного ограничения исследуются различные подходы, например, кавитация (образование разрывов) ГЭБ при использовании фокусированного ультразвукового воздействия под контролем магнитного резонанса [16]. Другим перспективным подходом повышения накопления лекарств в опухоли ГБМ является снабжение лекарственных соединений системами доставки [17, 18]. Для терапии глиом разрабатываются различные системы; среди них для защиты и доставки широкого спектра лекарств и вакцин в клетки особый интерес представляют липидные наночастицы (НЧ) [19]. Однако из-за низкой биодоступности, токсичности и стимуляции врожденного иммунитета они являются несовершенной системой доставки [20]. Для повышения эффективности накопления лекарственных соединений в клетках опухоли ГБМ были разработаны разнообразные НЧ для воздействия на поверхностные маркеры опухоли, рецепторы, аберрантные гены и сигнальные пути [21].



Среди рецепторов на поверхности клеток, участвующих в трансцитозе многих белков и пептидов через ГЭБ, особое значение представляет эндацитарный липопротеиновый рецептор LPR-1 массой 600 кДа, сверхэкспрессия которого наблюдается в клетках ГБМ головного мозга и в эндотелиальных клетках сосудов некоторых тканей ГЭБ [22, 23]. В исследованиях для нацеливания на LPR-1 широко используется олигопептид ангиопеп-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY, молекулярная масса 2.4 кДа), представитель семейства пептидов, полученных из домена Кунитца, который обеспечивает проникновение через ГЭБ посредством рецептор-опосредованного транспорта [24]. Ангиопеп-2 продемонстрировал большую способность к трансцитозу и накоплению в паренхиме, чем ингибитор протеаз апротинин. Данная способность ангиопеп-2 делает его перспективным агентом для доставки лекарств через ГБМ, который участвовал в клинических испытаниях [25; 26].

В связи с этим ранее показавшую многообещающие результаты в экспериментах *in vitro* [27, 28] фосфолипидную систему Се6 модифицировали дополнительно адресным компонентом – олигопептидом ангиопеп-2, обладающим высокой способностью к трансцитозу через ГЭБ. Физические свойства полученной модифицированной композиции, уровень накопления Се6 в опухолевых клетках U-87 MG и специфической активности были исследованы в экспериментах *in vitro*.

## МЕТОДИКА

### Синтез конъюгата DSPE-Peg2000-ANG

В работе использовали пептид Ангиопеп-2 (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY, ANG), синтезированный в лаборатории пептидной инженерии Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ), и коммерческий линкер DSPE-PEG2000-Maleimid («Nanosoft Polymers», США). Синтез конъюгата проводили согласно методике [29] с небольшими модификациями. Соотношение DSPE-Peg2000-Maleimid:ANG составляло 1:1 (молярное соотношение). Исходные реагенты растворяли в смеси фосфатно-солевого буфера (PBS, 0.1M, pH 7.4) («ПанЭко», Россия) и триэтиламина (1.45 mM, ТЭА) («Fluka», США). Инкубационную смесь барботировали аргоном в течение 24 ч при комнатной температуре при постоянном перемешивании.

После инкубации проводили диализ (3.5 кДа) против воды в течение 48 ч для удаления непрореагировавших веществ. Затем лиофильно высушивали и хранили готовый продукт при -20°C.

### Получение композиции встроенных в фосфолипидные наночастицы Се6 и ангиопеп-2

Для получения композиций был использован соевый фосфатидилхолин Lipoid S100 («Lipoid GmbH», Германия), субстанция ди-N-метил-D-глюкаминной соли Се6, с 50% содержанием Се6, полученная в Ивановском химико-технологическом университете (Россия).

Получение композиции с адресным фрагментом (NPh-Се6-ANG) проводили пленочным методом аналогично [30]. Кратко, навески Lipoid S100 и конъюгата

DSPE-Peg2000-ANG растворяли в небольшом количестве этилового спирта (2-3 мл) («Медхимпром», Россия). Полученные спиртовые растворы смешивали, после чего спирт упаривали на роторном испарителе Heidolph Laborota 4003 («Heidolph», Германия) в течение 8-10 мин при 60 mbar, температуре воды в бане 30°C и скорости вращения ротора 1190 об/мин. Полученную липидную пленку регидратировали дистиллированной водой с добавлением Се6. Грубую эмульсию обрабатывали на ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopuls («Bandelin», Германия) с использованием титанового стержня MS72 в течение 6 мин при мощности 50%. Образец сравнения – композицию Се6 без адресного фрагмента (NPh-Се6) – готовили аналогично, исключая этап внесения конъюгата. Размер и ζ-потенциал НЧ полученной композиции определяли на анализаторе Zetasizer Nano ZS («Malvern», Великобритания) с программным обеспечением Malvern ZETASIZER 6.20. Процент включения Се6 в НЧ оценивали методом ультрафильтрации с использованием микрофильтров VivaSpin 500, 5кДа («Sartorius AG», Германия). Концентрацию Се6 определяли методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1100 Series («Agilent Technologies», США) [31].

### Высвобождение Се6 из наночастиц *in vitro*

Оценку высвобождения Се6 из НЧ проводили методом диализа. Из каждой композиции NPh-Се6-ANG и NPh-Се6 (концентрация по Се6 250 мкг/мл) аликвоту 1 мл переносили в диализные мешки (3.5 кДа), которые помещали в 10 мл PBS (pH 7.4) при 37°C и инкубировали при перемешивании на магнитной мешалке. Через 0.25 ч, 0.5 ч, 1 ч, 1.5 ч, 2 ч, 3 ч и 24 ч проводили отбор аликвоты супернатанта (1 мл) и добавляли равное количество PBS. Высвобождение определяли с помощью спектрофотометра Agilent 8453 («Agilent Technologies») при 405 нм. Степень высвобождения лекарственного средства рассчитывали как отношение концентрации лекарственного средства (высвобожденного лекарственного средства из фосфолипидной НЧ) в данный момент времени на начальную концентрацию лекарственного средства в фосфолипидной НЧ.

### Оценка клеточного связывания и проникающей способности

Клеточную линию ГБМ человека U-87 MG, предоставленную лабораторией клеточной биологии ИБМХ, культивировали согласно приведенным в сертификате клеточных культур рекомендациям при 37°C в атмосфере с относительной влажностью 95% с содержанием 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-инкубатор «Binder», Германия). Использовали необходимые среды с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки крови («ПанЭко») [18]. В данной работе применяли клеточные линии от 3 до 10 пассажей.

Клетки U-87 MG (10<sup>6</sup> клеток на лунку) высевали в 6-луночные культуральные планшеты («Biologux», Китай) и инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Далее в концентрации 20 мкг/мл в пересчете на Се6 вносили образцы исследуемых композиций NPh-Се6-ANG и NPh-Се6; в качестве контроля использовали свободную субстанцию Се6, пробы инкубировали в течение 2 ч при двух температурных режимах: 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе («Сапуо», Япония) и 4°C в холодильном оборудовании («АТЛАНТ», Беларусь). После инкубации среду с композициями сливали,

клетки дважды промывали PBS. Себ экстрагировали раствором метанола («Fisher Scientific», Великобритания) с добавлением 0.1% муравьиной кислоты («Sigma», США) из расчета 1 мл на лунку. Собранные экстракты разделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин на настольной центрифуге Eppendorf 5810R («Eppendorf», Германия). Концентрацию Себ в полученных образцах измеряли с помощью ВЭЖХ системы Agilent 1200 Series с колонкой Eclipse XDB-C18 («Agilent Technologies») и масс-спектрометрическим детектором 6130 Quadrupole LC/MS («Agilent Technologies») [27]. Содержание Себ в клеточных культурах нормировали на содержание белка (мг), которое определяли методом Лоури.

Интернализацию вычисляли по разности содержания Себ при 37°C (общее накопление в клетках) и при 4°C (присоединение к клеточной поверхности) [32].

#### *Цитотоксическое действие и фотоиндуцированная активность in vitro*

Клетки U-87 MG высевали в стерильные 96-луночные культуральные планшеты («Biologix», Китай) в концентрации  $10^4$  клеток на лунку и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-инкубатор Sanyo) в течение 24-26 ч. Далее в планшеты вносили исследуемые образцы (NPh-Себ-ANG, NPh-Себ, Себ) в концентрациях 0.125 мкг/мл, 0.25 мкг/мл, 0.5 мкг/мл, 2.5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 10 мкг/мл и 25 мкг/мл по Себ и системы без активного вещества (NPh, NPh-ANG) в концентрациях 1.25 мкг/мл, 2.5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл и 250 мкг/мл по фосфатидилхолину; разведения образцов готовили с использованием культуральной среды. Клетки инкубировали с образцами при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Оценку жизнеспособности клеток проводили с использованием МТТ теста («Sisco Research Laboratories», Индия) через 24 ч, 48 ч и 72 ч инкубирования с образцами. В лунку добавляли по 60 мкл МТТ (1 мг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Затем среду удаляли и добавляли 100 мкл DMSO («ПанЭко»). Накрывали фольгой и взбалтывали клетки на орбитальном шейкере в течение 15 мин. Регистрировали поглощение при 570 нм (Multiscan FC, «ThermoSpectronic», США) и нормировали на необработанный контроль (без Себ).

Жизнеспособность клеток рассчитывали по уравнению (1):

$$\text{Жизнеспособность клеток (\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{образец}} - \text{OD}_{\text{бланк}}}{\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{бланк}}} \times 100\% \quad (1)$$

Для оценки фотоиндуцированной активности клетки U-87 MG инкубировали с композициями Себ (NPh-Себ, NPh-Себ-ANG, Себ) в указанных выше концентрациях в течение 2 ч. После инкубации клетки подвергали облучению лазером с длиной волны 638 нм (экспериментальная лазерная установка, Институт фотонных технологий ФНИЦК РАН, Москва, Россия) в течение 30 мин (доза 1.5 Дж/см<sup>2</sup>). Далее клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-инкубатор Sanyo) в течение 24 ч и проводили оценку жизнеспособности с помощью МТТ теста. Критерием оценки фотоиндуцированной активности являлась величина IC<sub>50</sub> (концентрация, вызывающая гибель 50%

клеток), которую рассчитывали онлайн с помощью сайта ААТ Bioquest [33].

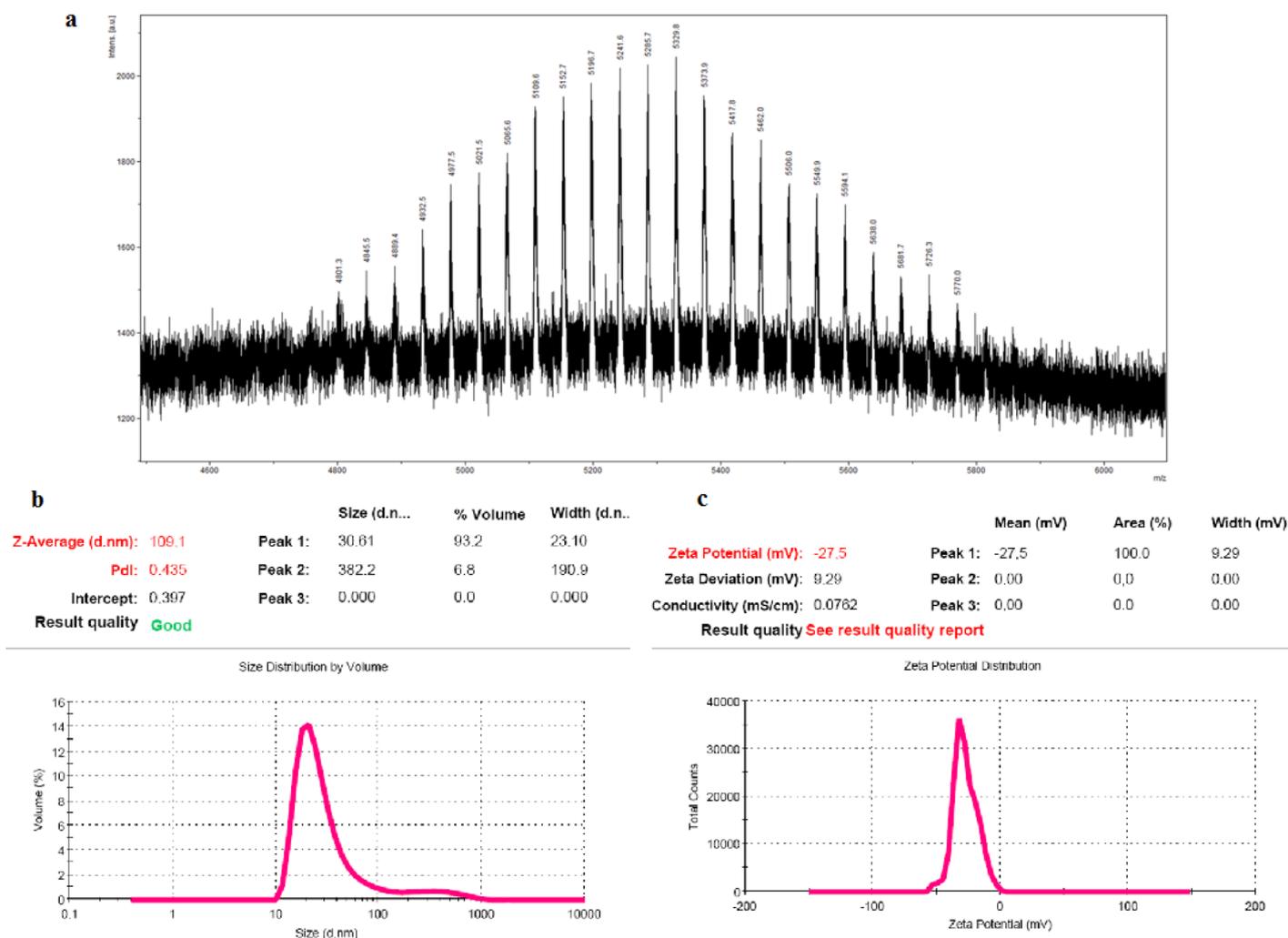
#### *Статистическая обработка*

Для оценки достоверности различий измеряемых параметров по трём повторностям использовали критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p \leq 0.05$ . На рисунках данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Терапия злокачественных новообразований головного мозга включает в себя текущие стандарты лечения – максимальную и безопасную хирургическую резекцию с последующей одновременной химиотерапией и фракционированной лучевой терапией. Однако инфильтрирующий рост опухоли и степень резекции трудно оценить интраоперационно, часто остаются инфильтративные клетки, которые в последствии приводят к рецидивам. Применение ФДТ становится наиболее популярным, так как дает возможность для резекции опухолей под флуоресцентным контролем, а также использование ее после хирургического вмешательства. Проведение хирургического вмешательства под флуоресцентным контролем и ФДТ позволяет не только визуализировать опухолевые клетки, но избирательно разрушать их [34]. Однако ГЭБ служит серьезным препятствием для препаратов, используемых при ФДТ. Применение нанотехнологий может позволить повысить доставку ФС к конкретным опухолевым клеткам и улучшить фармакокинетику лекарств. Поэтому разработанная ранее фосфолипидная наносистема Себ была модифицирована адресным вектором ANG, специфичным к экспрессирующему на поверхности клеток ГБМ и участвующему в переносе через ГЭБ посредством рецептор-опосредованного транспорта рецептору липопротеинов низкой плотности LPR-1 [22]. Для «закрепления» ANG в липидных НЧ необходимо было получить имеющий сродство к фосфолипидам конъюгат. Поэтому проводили реакцию связывания между тиоловой группой ANG и малеимидной DSPE-Peg2000-Mal с получением конъюгата DSPE-Peg2000-ANG, синтез которого подтверждали методом MALDI-TOF. Спектр синтезируемого продукта представлен на рисунке 1а, где наблюдалось присутствие сигнала целевого соединения. Полученный конъюгат использовали для встраивания в фосфолипидные Себ-содержащие НЧ (композиция NPh-Себ-ANG). Исследования физических параметров полученной композиции NPh-Себ-ANG показали, что размер частиц составлял  $31.98 \pm 1.98$  нм (PdI  $0.453 \pm 0.03$ ), доля частиц заданного размера составляла около 93% (рис. 1b). Значение  $\zeta$ -потенциала для NPh-Себ-ANG составляло  $-27.43 \pm 1.14$  мВт (рис. 1с).

В более ранних исследованиях [28] физические свойства были изучены для фосфолипидной композиции NPh-Себ. Размер частиц соответствовал 18 нм (доля частиц указанного размера 96%), значение  $\zeta$ -потенциала составляло -23 мВ [28]. То есть внесение олигопептида приводило к увеличению размера НЧ; при этом значение  $\zeta$ -потенциала исследуемой композиции NPh-Себ-ANG изменялось незначительно, приводя к снижению стабильности. Согласно классификации по уровню  $\zeta$ -потенциала наноземульсий,

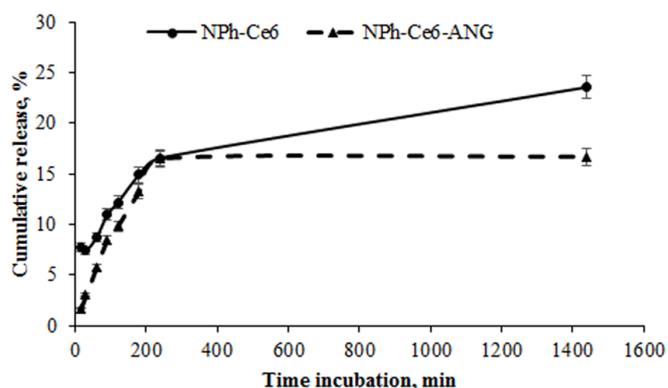


**Рисунок 1.** Спектр синтезированного конъюгата (DSPE-Peg2000-ANG) полученный методом MALDI-TOF (a). Физические параметры фосфолипидной композиции NPh-Ce6-ANG: размер частиц (b) и  $\zeta$ -потенциал (c).

где  $\pm 20$ – $30$  мВ и  $> \pm 30$  мВ характеризуются как умеренно стабильные и высокостабильные соответственно [35], композиция NPh-Ce6-ANG соответствовала значениям умеренно стабильной эмульсии. Важным характеризующим фосфолипидную композицию параметром является процент включения лекарственной субстанции в НЧ, который составил  $98.6 \pm 0.43\%$  Ce6, что свидетельствовало о практически полном ее встраивании.

Моделирование различных условий позволит понять и предположить действие композиции и её активных компонентов в условиях *in vivo*. Естественный градиент pH в эндосомах или лизосомах опухолевых клеток составляет 4.0–6.5, в микроокружении опухоли – 6.5–7.2 [36], pH крови при нормальных условиях – 7.35–7.45 [37]. Поэтому в эксперименте *in vitro* была исследована степень извлечения лекарства из НЧ при нейтральном значении pH-среды. Результаты показали, что в начальной точке инкубации (через 15 мин) уровень высвобождения Ce6 из НЧ в системе без адресного компонента в значительной степени превосходил значения композиции с ANG в 4.5 раза. Через 4 ч инкубации значения для исследуемых образцов выравнивались и составляли около 16.5% (рис. 2).

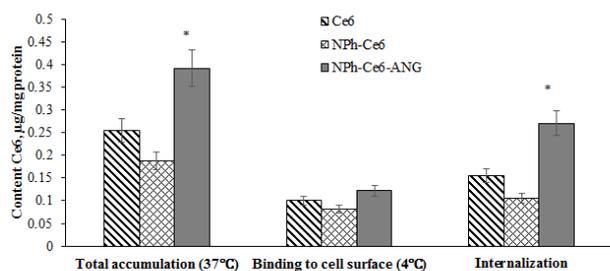
Следует отметить, что через 24 ч инкубации фосфолипидной композиции без адресного пептида (NPh-Ce6) в окружающем растворе продолжал обнаруживаться Ce6, т.е. наблюдался выход субстанции из НЧ, который составил



**Рисунок 2.** Высвобождение Ce6 из наночастиц методом диализа при инкубации NPh-Ce6 и NPh-Ce6-ANG в растворе с pH 7.4.

около 24%, а для композиции с адресным пептидом (NPh-Ce6-ANG), начиная с 4 ч инкубации, значение высвобожденного лекарства не изменялось.

Таким образом, максимальное высвобождение лекарства в обоих исследуемых вариантах композиций наступало через 4 ч инкубации; через 3 ч инкубации фосфолипидной композиции Ce6 с ANG высвобождалось около 13.3% лекарства, а в композиции NPh-Ce6 – 14.9%. При этом адресный компонент влиял именно в начальный



**Рисунок 3.** Накопление Се6 в клетках глиобластомы человека U-87 MG после 24 инкубации с фосфолипидными композициями и субстанцией Се6. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3).

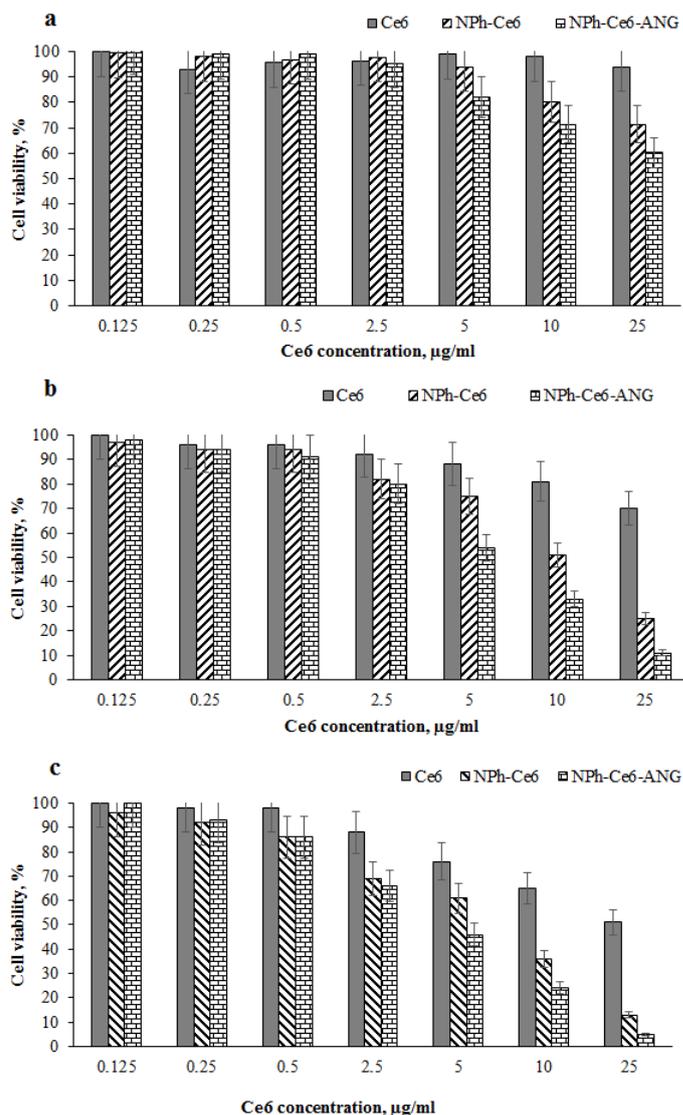
период времени, не давая частице «раскрыться» сразу. Можно предположить, что при попадании композиции Се6 с ANG в кровяное русло выход лекарства будет минимальным.

Согласно литературным данным, на поверхности клеток ГБМ человека U-87 MG наблюдается экспрессия рецептора LPR-1 [38]. Результаты оценки клеточного накопления Се6 на указанной клеточной линии после инкубации с композициями, содержащими адресный компонент и без него, представлены на рисунке 3.

Использование адресного пептида ANG показало повышение значений как общего накопления, так и проникновения внутрь клетки (интернализации) ФС. По сравнению с использованием свободной субстанции общее накопление Се6 повышалось на 33%, а интернализация – на 40%. Однако при использовании композиции без адресного компонента (NPh-Се6) эффекта в повышении как общего накопления, так и интернализации Се6 на данной культуре клеток отмечено не было.

Результаты исследования цитотоксического действия разработанной композиции через 24 ч, 48 ч и 72 ч инкубации представлены в сравнении с действием фосфолипидной композиции Се6 и свободной субстанции на рисунке 4. Через 24 ч инкубации клеток с образцами в минимальных концентрациях от 0.125 мкг/мл до 2.5 мкг/мл различий между вариантами не наблюдалось, процент живых клеток составлял 100% (рис. 4а). Увеличение концентрации Се6 приводило к снижению процента живых клеток и в варианте с максимально используемой концентрацией 25 мкг/мл он составлял 60% для NPh-Се6-ANG. Аналогичное дозозависимое действие было отмечено при инкубации с веществами в течение 48 ч (рис. 4б) и 72 ч (рис. 4с); наблюдалась более высокая степень гибели клеток, процент живых клеток составлял для композиции NPh-Се6-ANG 11% и 5% соответственно.

На жизнеспособность клеток может оказывать влияние не только используемая лекарственная субстанция, но и другие компоненты системы. Поэтому было исследовано влияние фосфолипидных НЧ (NPh) и фосфолипидных НЧ с ANG (NPh-ANG) без Се6 на жизнеспособность клеток U-87 MG. Процент живых клеток снижался только в варианте с максимальной концентрацией липида (по фосфатидилхолину 250 мкг/мл) на 30% по сравнению с другими концентрациями (рис. 5). Поэтому можно предположить, что через 72 ч инкубации (рис. 4с), усиление эффекта было обусловлено взаимным влиянием всех компонентов композиции NPh-Се6-ANG на опухолевые

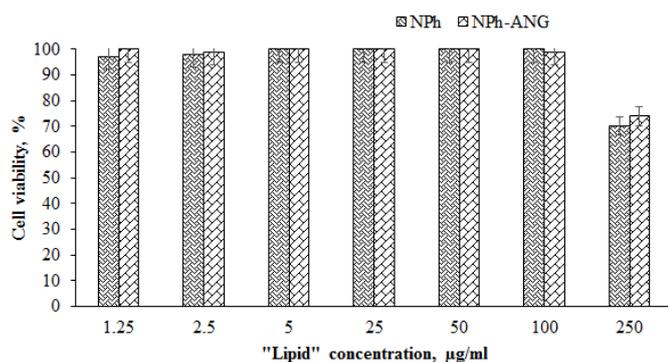


**Рисунок 4.** Жизнеспособность клеток U-87 MG после инкубации с композициями и субстанцией Се6 в различных концентрациях через 24 ч (а), 48 ч (б) и 72 ч (с). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3).

клетки.

Следует отметить, что для свободной субстанции подавление жизнедеятельности опухолевых клеток происходило только на 50% (рис. 4с). Снижение жизнеспособности опухолевых клеток при инкубации с фосфолипидной композицией Се6 была практически одинаковой наряду с содержащей адресный пептид композицией (NPh-Се6-ANG). Достоверное различие между этими вариантами было отмечено в максимальной концентрации по Се6 через 48 ч и 72 ч инкубирования (рис. 4б и рис. 4с соответственно).

В качестве критерия оценки фотоиндуцированной активности использовали величину  $IC_{50}$  (концентрация ФС в среде, после воздействия которой наблюдается гибель 50% клеток). Клетки подвергали воздействию лазера в дозе 1.5 Дж/см<sup>2</sup>. Исследование фотоиндуцированной активности показало, что использование адресного пептида (ANG) привело к снижению величины  $IC_{50}$  для композиции NPh-Се6-ANG в 1.33 раза по сравнению со свободной субстанцией. Так, для свободной субстанции  $IC_{50}$  составляло  $3.81 \pm 0.11$  мкг/мл, а для композиции NPh-Се6-ANG –  $2.85 \pm 0.1$  мкг/мл. Значение  $IC_{50}$  для фосфолипидной



**Рисунок 5.** Жизнеспособность клеток U-87 MG после инкубации в течение 24ч фосфолипидных наносистем в различных концентрациях по фосфатидилхолину. Данные представляли собой среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=4).

композиции Себ (NPh-Себ) было аналогично значению для композиции с пептидом и составило 2.91 мкг/мл. Таким образом, внесение адресного компонента не повлияло на изменение фотоиндуцированной активности ФС, большую степень влияния оказало встраивание Себ в фосфолипидные НЧ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты в экспериментах *in vitro* показали эффективность разработанной композиции встроеного в фосфолипидные НЧ Себ с адресным пептидом ангиопеп-2. Композиция NPh-Себ-ANG может быть полезной и перспективной в клиническом применении для лечения ГМБ. Также система фосфолипидных НЧ с адресным пептидом ангиопеп-2 может быть использована для встраивания других ФС для их направленной доставки. Полученные результаты интернализации Себ свидетельствуют о возможном «связывании» векторной молекулы ангиопеп-2 с рецептором на поверхности опухолевых клеток, однако с какими именно, исследование в данной работе не проводилось. Особенно интересным представляется эксперимент *in vivo*, с помощью которого можно будет оценить возможный механизм и степень переноса лекарства в составе данной композиции через ГЭБ.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории клеточной биологии ИБМХ Я.С. Киму и к.б.н. А.М. Гисиной за предоставление клеточного материала для экспериментов *in vitro*, а также ЦКП «Протеом человека» ИБМХ за помощь в постановке и проведении эксперимента методом MALDI-TOF, генеральному директору «Солитон Фотоникс» (Москва) к.ф.-м.н. К.В.Зотову за предоставление лазерной установки для проведения экспериментов по исследованию фотоиндуцированной активности *in vitro*. Также авторы выражают благодарность за предоставление

пептида сотрудникам лаборатории пептидной инженерии ИБМХ д.б.н., профессору, зав. лабораторией Е.Ф. Колесановой и к.б.н. м.н.с. О.В. Чибисковой.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 122030100170-5).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cramer S.W., Chen C.C. (2020) Photodynamic therapy for the treatment of glioblastoma. *Frontiers in Surgery*, **6**(81). DOI: 10.3389/fsurg.2019.00081
2. Vermandel M., Dupont C., Lecomte F., Leroy H. A., Tuleasca C., Mordon S., Hadjipanayis C. G., Reyns, N. (2021) Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *Journal of Neuro-Oncology*, **152**(3), 501-514. DOI: 10.1007/s11060-021-03718-6
3. Dupont C., Vermandel M., Leroy H. A., Quidet M., Lecomte F., Delhem N., Mordon S., Reyns, N. (2019) INtraoperative photoDYNAMIC therapy for GliOblastomas (INDYGO): study protocol for a phase I clinical trial. *Neurosurgery*, **84**(6), 414-419. DOI: 10.1093/neuros/nyy324
4. Mahmoudi K., Garvey K.L., Bouras A., Cramer G., Stepp H., Jesu Raj J.G., Bozec D., Busch T.M., Hadjipanayis C.G. (2019) 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy for the treatment of high-grade gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, **141**(3), 595-607. DOI: 10.1007/s11060-019-03103-4
5. Kim H.S., Lee D.Y. (2022) Nanomedicine in clinical photodynamic therapy for the treatment of brain tumors. *Biomedicines*, **10**(1), 96. DOI: 10.3390/biomedicines10010096
6. Eljamel M.S., Goodman C., Moseley H. (2008) ALA and Photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre Phase III randomised controlled trial. *Lasers in Medical Science*, **23**(4), 361-367. DOI: 10.1007/s10103-007-0494-2
7. Li Y., Yu Y., Kang L., Lu Y. (2014) Effects of chlorin e6-mediated photodynamic therapy on human colon cancer SW480 cells. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **7**(12), 4867-4876.
8. Mikaelyan K.A., Krylov K.Y., Petrova M.V., Shestopalov A.E. (2021) Изменение морфологии и микробиотозноза кишечнога у нейрохирургических пациентов в критическом состоянии [Intestine morphology and microbiocenosis changes in critically ill patients in neurosurgery]. *Zhurnal Voprosy Neurokhirurgii Imeni N. N. Burdenko*, **85**(1), 104-110. DOI: 10.17116/neiro202185011104
9. Rynda A.Y., Olyushin V.E., Rostovtsev D.M., Zabrodskaya Y.M., Papayan G.V. (2022) Sravnitel'nyi analiz fluorestsentnoi navigatsii v khirurgii zlokachestvennykh gliom s ispol'zovaniem 5-ALA i khlorina E6 [Comparative analysis of 5-ALA and chlorin E6 fluorescence-guided navigation in malignant glioma surgery]. *Khirurgiia*, (1), 5-14. DOI: 10.17116/hirurgia20220115
10. Kozlikina E.I., Trifonov I.S., Sinkin M.V., Krylov V.V., Loschenov V.B. (2022) The combined use of 5-ALA and chlorin e6 photosensitizers for fluorescence-guided resection and photodynamic therapy under neurophysiological control for recurrent glioblastoma in the functional motor area after ineffective use of 5-ALA: preliminary results. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, **9**(3), 104. DOI: 10.3390/bioengineering9030104
11. Hak A., Ali M.S., Sankaranarayanan S.A., Shinde V.R., Rengan A.K. (2023) Chlorin e6: a promising photosensitizer in photo-based cancer nanomedicine. *ACS Applied Bio Materials*, **6**(2), 349-364. DOI: 10.1021/acsabm.2c00891
12. Kim T.E., Chang J.E. (2023) Recent studies in photodynamic therapy for cancer treatment: from basic research to clinical trials. *Pharmaceutics*, **15**(9), 2257. DOI: 10.3390/pharmaceutics15092257
13. Gilyadova A., Ishchenko A., Shiryaev A., Alekseeva P., Efendiev K., Karpova R., Loschenov M., Loschenov V., Reshetov I. (2022) Phototheranostics of cervical neoplasms with chlorin e6 photosensitizer. *Cancers*, **14**(1), 211. DOI: 10.3390/cancers14010211
14. Pardridge W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **2**(1), 3-14. DOI: 10.1602/neuroRx.2.1.3
15. Novell A., Kamimura H.A.S., Cafarelli A., Gerstenmayer M., Flament J., Valette J., Agou P., Conti A., Selingue E., Aron Badin R., Hantraye P., Larrat B. (2020). A new safety index based on intrapulse monitoring of ultra-harmonic cavitation during ultrasound-induced blood-brain barrier opening procedures.

- Scientific reports, **10**(1), 10088. DOI: 10.1038/s41598-020-66994-8
16. *Bhunia S., Kolishetti N., Vashist A., Yndart Arias A., Brooks D., Nair M.* (2023). Drug delivery to the brain: recent advances and unmet challenges. *Pharmaceutics*, **15**(12), 2658. DOI: 10.3390/pharmaceutics15122658
17. *Sharma G., Sharma A.R., Lee S.S., Bhattacharya M., Nam J.S., Chakraborty C.* (2019). Advances in nanocarriers enabled brain targeted drug delivery across blood brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, **559**, 360-372. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.01.056
18. *Liu J., Sun Y., Zeng X., Liu Y., Liu C., Zhou Y., Liu Y., Sun G., Guo M.* (2023) Engineering and characterization of an artificial drug-carrying vesicles nanoplatform for enhanced specifically targeted therapy of glioblastoma. *Advanced materials* (Deerfield beach, Fla.), **35**(41), e2303660. DOI: 10.1002/adma.202303660
19. *Miranda A., Blanco-Prieto M. J., Sousa J., Pais A., Vitorino C.* (2017) Breaching barriers in glioblastoma. Part II: Targeted drug delivery and lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, **531**(1), 389-410. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.07.049
20. *Zhao Y., Li D., Zhao J., Song J., & Zhao Y.* (2016) The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) in regulating blood-brain barrier integrity. *Reviews in the Neurosciences*, **27**(6), 623-634. DOI: 10.1515/revneuro-2015-0069
21. *Xin H., Jiang X., Gu J., Sha X., Chen L., Law K., Chen Y., Wang X., Jiang Y., Fang X.* (2011) Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials*, **32**(18), 4293-4305. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.044
22. *Demeule M., Régina A., Ché C., Poirier J., Nguyen T., Gabathuler R., Castaigne J.P., Béliveau R.* (2008) Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **324**(3), 1064-1072. DOI: 10.1124/jpet.107.131318
23. *Habib S., Singh M.* (2022). Angiopep-2-modified nanoparticles for brain-directed delivery of therapeutics: a review. *Polymers*, **14**(4), 712. DOI: 10.3390/polym14040712
24. *Kumthekar P., Tang S.C., Brenner A.J., Kesari S., Piccioni D.E., Anders C., Carrillo J., Chalasani P., Kabos P., Puhalla S., Tkaczuk K., Garcia A.A., Ahluwalia M.S., Wefel J.S., Lakhani N., Ibrahim N.* (2020) ANG1005, a brain-penetrating peptide-drug conjugate, shows activity in patients with breast cancer with leptomeningeal carcinomatosis and recurrent brain metastases. *Clinical cancer research: an official journal of the American association for cancer research*, **26**(12), 2789-2799. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3258
25. *Kostruykova L. V., Prozorovskiy V. N., Medvedeva N. V., Ipatova O. M.* (2018) Comparison of a new nanoform of the photosensitizer chlorin e6, based on plant phospholipids, with its free form. *FEBS Open Bio*, **8**(2), 201-210. DOI: 10.1002/2211-5463.12359
26. *Torkhovskaya T.I., Kostryukova L.V., Tereshkina Y.A., Tikhonova E.G., Morozevich G.E., Plutinskaya A.D., Lupatov A.Y., Pankratov A.A.* (2021) Chlorin e6 embedded in phospholipid nanoparticles equipped with specific peptides: Interaction with tumor cells with different aminopeptidase N expression. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, **134**, 111154. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111154
27. *Chen C., Duan Z., Yuan Y., Li R., Pang L., Liang J., Xu X., Wang J.* (2017) Peptide-22 and cyclic RGD functionalized liposomes for glioma targeting drug delivery overcoming BBB and BBTB. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9**(7), 5864-5873. DOI: 10.1021/acsami.6b15831
28. *Kostruykova L.V., Tereshkina Y.A., Korotkevich E.I., Prozorovskiy V.N., Torkhovskaya T.I., Morozevich G.E., Toropygin I.Y., Konstantinov M.A., Tikhonova E.G.* (2020) Targeted drug delivery system for doxorubicin based on a specific peptide and phospholipid nanoparticles. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(6), 464-468. DOI: 10.18097/PBMC20206606464
29. *Tikhonova E.G., Sanzhakov M.A., Tereshkina Y.A., Kostryukova L.V., Khudoklinova Y.Y., Orlova N.A., Bobrova D.V., Ipatova O.M.* (2022) Drug transport system based on phospholipid nanoparticles: production technology and characteristics. *Pharmaceutics*, **14**(11), 2522. DOI:10.3390/pharmaceutics14112522
30. *Sheldon K., Liu D., Ferguson J., Garipey J.* (1995) Lologomers: Design of de novo peptide-based intracellular vehicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(6), 2056-2060. DOI: 10.1073/pnas.92.6.2056
31. IC50 Calculator <https://www.aatbio.com>
32. *Cramer S.W., Chen C.C.* (2020) Photodynamic therapy for the treatment of glioblastoma. *Frontiers in surgery*, **6**, 81. DOI: 10.3389/fsurg.2019.00081
33. *Patel V.R., Agrawal Y.K.* (2011) Nanosuspension: an approach to enhance solubility of drugs. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, **2**(2), 81-87. DOI: 10.4103/2231-4040.82950
34. *Seo J.W., Ang J., Mahakian L.M., Tam S., Fite B., Ingham E.S., Beyer J., Forsayeth J., Bankiewicz K.S., Xu T., Ferrara K.W.* (2015) Self-assembled 20-nm (64)Cu-micelles enhance accumulation in rat glioblastoma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **220**(Pt A), 51-60. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.09.057
35. *Mohanty I., Parija S.C., Suklabaidya S., Rattan S.* (2018) Acidosis potentiates endothelium-dependent vasorelaxation and gap junction communication in the superior mesenteric artery. *European Journal of Pharmacology*, **827**, 22-31. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.03.004
36. *Shruthi N.R., Behera M.M., Naik S.K., Das S.K., Gopan S., Ghosh A., Sahu R.N., Patra S., Purkait S.* (2022) Elevated expression of cholesterol transporter LRP-1 is crucially implicated in the pathobiology of glioblastoma. *Frontiers in Neurology*, **13**, 1003730. DOI: 10.3389/fneur.2022.1003730

Поступила: 31.07.2024  
После доработки: 03.09.2024  
Принята к публикации: 08.09.2024

## THE PHOSPHOLIPID SYSTEM WITH THE TARGETED PEPTIDE ANGIOPEP-2 FOR DELIVERY OF CHLORINE E6 AN *IN VITRO* STUDY

Y.A. Tereshkina\*, L.V. Kostryukova, A.M. Pyatigorsky, E.G. Tikhonova

Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \* e-mail: burova13@gmail.com

The previously obtained phospholipid nanosystem for the delivery of the photosensitizer chlorine e6 was modified with a targeting ligand, the oligopeptide angiopep-2, exhibiting a high ability to transcytose through the blood-brain barrier. This feature of angiopep-2 is especially relevant for the targeted delivery of therapeutic and diagnostic agents to pathological area (tumor) of the brain. According to the analysis of the physico-chemical parameters of the developed composition, the particle size was  $31.98 \pm 1.98$  nm (PDI  $0.453 \pm 0.03$ ), the  $\zeta$ -potential corresponded to  $-27.43 \pm 1.14$  mV, while the substance was almost completely ( $98.6 \pm 0.43\%$ ) incorporated into nanoparticles. An *in vitro* experiment on the human glioblastoma cell line U-87 MG showed an increase in the total accumulation and internalization of chlorine e6 in the variant with the phospholipid form containing the targeted peptide compared with the free substance by 33% and 40%, respectively. The study of the cytotoxic action without irradiation showed no differences between the samples in the concentration range from 0.125  $\mu\text{g/ml}$  to 2.5  $\mu\text{g/ml}$  (in terms of to chlorine e6); the percentage of living cells was about 100%. The study of the photoinduced activity (with a dose 1,5 J  $\text{cm}^{-2}$  irradiation) showed that the  $\text{IC}_{50}$  value for the obtained composition was 1,33 times lower than that for the free substance and amounted to  $2.85 \pm 0.1$   $\mu\text{g/ml}$ . The results of the experiments suggest the prospects of the developed composition and the clear need for further studies *in vitro* and *in vivo*.

**Key words:** angiopep-2; phospholipid nanoparticles; chlorine e6

### FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) (№ 122030100170-5).

Received: 31.07.2024, revised: 03.09.2024, accepted: 08.09.2024