



## ПОВЕДЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ КОНЬЮГАТОВ ДОКСОРУБИЦИНА В ЛИПИДНОМ БИСЛОЕ ЛИПОСОМ<sup>1</sup>

© 2019 г. А. С. Алексеева\*, А. О. Чугунов\*, \*\*, П. Е. Волынский\*, Н. Р. Онищенко\*, Ю. Г. Молотковский\*, Р. Г. Ефремов\*, \*\*\*, \*\*\*\*, И. А. Болдырев\*, \*\*\*\*, Е. Л. Водовозова\*, #

\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*НИУ Высшая школа экономики, Москва, 101000, Россия

\*\*\*Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный, 141700, Россия

\*\*\*\*Национальный Исследовательский Технологический Университет МИСиС, Россия, 119049, Москва, Ленинский просп., 4

Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

После доработки 21.05.2018 г.

Принята к печати 04.06.2018 г.

Получение липосомальных препаратов путем включения водорастворимых лекарств в липидный бислой в виде липофильных пролекарств представляет значительный интерес. Ранее мы синтезировали диолеилглицеридный и олеоильный конъюгаты доксорубина, предназначенные для встраивания в жидкофазный бислой липосом. В данной работе исследовано влияние структуры липидных производных доксорубина на их поведение в бислоях из пальмитоилолеилфосфатидилхолина и димристоилфосфатидилхолина с помощью флуоресцентных методов и молекулярного моделирования. Показано, что конъюгаты обладают ограниченной подвижностью в липидном бислое, что во многом обусловлено образованием водородных связей между агликоном доксорубина и фосфатными группами липидов. Молекулы липофильных конъюгатов также склонны к кластеризации в мембране липосом за счет взаимодействий между остатками доксорубина. При этом олеоильные остатки вытягиваются параллельно ацильным цепям липидов. Олеоильный конъюгат сильнее взаимодействует с бислоем по сравнению с диглицеридным за счет образования большего количества водородных связей. Обнаруженные свойства производных доксорубина могут способствовать их включению в липидный бислой в достаточных с точки зрения терапевтического эффекта количествах, а также внутриклеточному высвобождению антибиотика за счет ферментализа.

*Ключевые слова:* доксорубин, липосомы, липофильные пролекарства, липидный бислой, анизотропия флуоресценции, молекулярная динамика

DOI: 10.1134/S0132342319010020

### ВВЕДЕНИЕ

Применение липосом в качестве систем доставки лекарств является на сегодня признанным подходом к повышению эффективности лечения и улучшению качества жизни онкологических больных [1]. На мировом рынке наномедицинских препаратов, предназначенных для систем-

ного введения, средства на основе липосом занимают лидирующую позицию. Известный пример успешного липосомального препарата для противоопухолевой терапии — Doxil®/Caelyx® (также с 2013 г. доступен дженерик Lipodox®), который представляет собой пегилированные (то есть покрытые полиэтиленгликольными цепями для экранирования от захвата клетками ретикуло-эндотелиальной системы) липосомы диаметром около 100 нм с инкапсулированным антибиотиком доксорубином [2]. Липидный бислой липосом названных препаратов построен из насыщенных фосфолипидов и холестерина, образующих жесткую “конденсированную” мембрану, устойчивую к преждевременному разрушению в кровотоке. В технологии производства этих препаратов используется метод эффективного ин-

<sup>1</sup> Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Липиды XXI века. Первая четверть”, 22–23 октября 2018 г., г. Москва.

Сокращения: DOX — доксорубин; DOX-DG — диолеилглицеридный конъюгат DOX; DOX-Ole — олеоильный конъюгат DOX; PBS — физиологический раствор, приготовленный на фосфатном буфере; POPC — 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицерофосфохолин; DMPC — 1,2-димристоил-*sn*-глицерофосфохолин; МД — молекулярная динамика.

# Автор для связи: (тел.: 8 (495) 330-66-10; эл. почта: elvod@lipids.ibch.ru).

капсулирования водорастворимых субстанций во внутренний объем липосом — remote loading, то есть дистанционная, или, так называемая, активная загрузка, когда лекарство диффундирует через липидный бислой против градиентов концентраций некоторых солей [3]. Внутри липосомы лекарство накапливается в виде осадка, образуя, как правило, кристаллическую фазу, за счет чего повышается емкость наноразмерного носителя (молярное отношение лекарство/липиды достигает 0.2–0.25). При пассивном инкапсулировании раствора лекарства в липосомы получить терапевтически значимую концентрацию действующего вещества проблематично, поскольку внутренний водный объем наноразмерных носителей слишком мал. С другой стороны, метод активной загрузки осуществим только для амфифильных слабых кислот или оснований, в том числе для антибиотиков антрациклинового ряда, типа доксорубина.

Липосомы Doxil®, при всех отмеченных выше достоинствах, имеют ряд недостатков, среди которых затрудненная интернализация клетками опухолей самого разного типа, а также слишком медленное внутриклеточное высвобождение доксорубина [4, 5]. В связи с этим, продолжаются поиски других вариантов модификации доксорубина (DOX), в том числе путем превращения в липидные производные с целью улучшения поглощения клетками [6–9]. DOX представляется удобным объектом для изучения механизмов действия его производных на (суб)клеточном уровне и *in vivo* с помощью флуоресцентных методов, так как он обладает собственной флуоресценцией в красной области спектра ( $\lambda_{\text{возб}}/\lambda_{\text{исп}}$  495/595 нм).

Молекула DOX состоит из тетрациклического антрахиноидного агликона доксорубинона, соединенного гликозидной связью с аминсахаром даунозамином (рис. 1). Модификации по остатку даунозамина или по гидроксилу гидроксиацетильного остатка агликона не должны отражаться на оптических свойствах тетрациклического флуорофора в интересующей области спектра. Интересно, что скваленоильные эфиры DOX по гидроксилу гидроксиацетильного остатка способны самопроизвольно образовывать наночастицы оригинальной формы “loop-train”, которые на мышинных моделях показали усиление торможения роста опухолей на фоне уменьшения общей токсичности по сравнению с DOX [8]. Жирнокислотные ациламиды DOX также обладают цитотоксической активностью, хотя и пониженной по сравнению со сложноэфирными производными [6, 7, 9]. Это объясняется меньшей способностью к расщеплению внутриклеточными ферментами амидной связи, чем эфирной, в

силу более высокой специфичности амидаз по сравнению с эстеразами [10].

Альтернативным способом нагрузки липосом водорастворимыми субстанциями является включение их в липидный бислой в виде липидных производных — липофильных пролекарств (см. обзоры [11–13]). Такая конструкция липосомальных препаратов способствует улучшению их фармакологических свойств: позволяет получить наноразмерные липосомы с приемлемой емкостью загрузки (причем при использовании упрощенной технологии производства), уменьшает вероятность потерь активной субстанции в ходе циркуляции в кровотоке и на стадии взаимодействия с клеткой-мишенью, способна облегчить внутриклеточную разгрузку за счет возможности прямого трансмембранного переноса амфифильного вещества. После интернализации клеткой липофильное пролекарство расщепляется эндогенными ферментами с высвобождением активного начала. Нами разработаны липосомы с жидкофазным липидным бислоем на основе природных фосфолипидов и диолеилглицеридных сложноэфирных конъюгатов широко применяемых в клинике химиотерапевтических средств — алкилирующего агента мелфалана и метотрексата, антиметаболита фолиевой кислоты [14]. Противоопухолевая эффективность липосомальных препаратов подтверждена в экспериментах *in vivo* на моделях опухолей мышей [15, 16].

Ранее мы синтезировали диолеилглицеридный конъюгат доксорубина DOX-DG (рис. 1), предназначенный для включения в жидкофазный бислой липосом (неопубл. данные). Показано, что DOX-DG в составе 100-нм липосом эффективно поглощается клетками путем эндоцитоза (что важно для преодоления множественной лекарственной устойчивости, обусловленной функцией белков семейства АТР-связывающих кассет) [17]. Затем, с целью упрощения синтеза липофильного пролекарства, а также имея в виду его более быстрый, чем для DOX-DG, ферментолит в клетке (в результате гидролиза DOX-Ole эстеразами образуется гидроксиацетиламид доксорубина, последующий гидролиз которого амидазами с высвобождением DOX облегчен), был синтезирован олеоильный конъюгат DOX-Ole (рис. 1). Однако оказалось, что это производное плохо включается в липосомы.

Цель настоящей работы — сравнение поведения липидных конъюгатов доксорубина различной структуры в липидном бислое с помощью флуоресцентных методов и молекулярного моделирования.

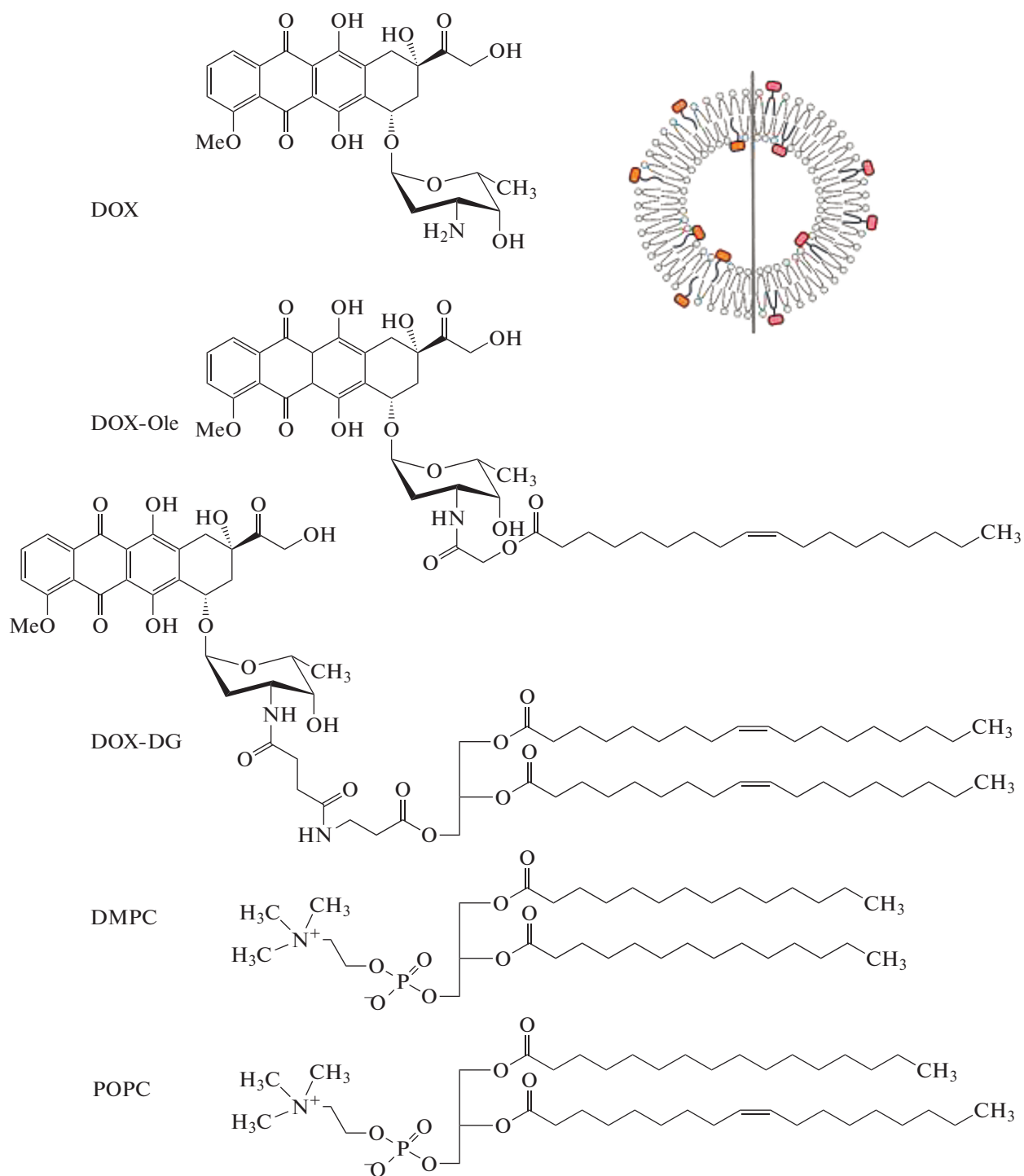


Рис. 1. Структуры доксорубина (DOX), липидных конъюгатов DOX-Ole и DOX-DG, фосфолипидов (POPC, DMPC) и схематическое изображение липосомы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Флуоресцентные измерения

Анизотропия флуоресценции (поляризация флуоресценции,  $r$ ) характеризует угол вращения молекулы в течение жизни возбужденного состо-

яния и является мерой подвижности молекул. Одна из характеристик флуорофора — его внутренняя анизотропия  $r_0$ , то есть максимально возможное значение анизотропии флуоресценции полностью неподвижной молекулы (ее измеряют в твердом растворе, например, в замороженном

**Таблица 1.** Анизотропия флуоресценции ( $r$ ) доксорубина и его производных в водном растворе (PBS) и в дисперсиях липосом (PBS) при 16°C, а также внутренняя анизотропия DOX

Препарат	DOX			DOX-DG		DOX-Ole	
	—*	— (PBS)	DMPC	DMPC	POPC	DMPC	POPC
$r$	<b>0.33(<math>r_0</math>)</b>	0.08	0.14	0.24	0.25	0.24	0.29

\* В твердом растворе [18].

до  $-70^\circ\text{C}$  пропиленгликоле). Для доксорубина величина  $r_0$  равна 0.33 [18]. Степень поляризации флуоресценции уменьшается, когда флуорофоры получают возможность свободно вращаться. В водном растворе молекула DOX весьма подвижна — значение анизотропии  $r$  падает до 0.08 (табл. 1). При добавлении липосом в раствор доксорубина анизотропия DOX возрастает до 0.14, что свидетельствует о связывании молекулы поверхностью липосом. Еще более высокие значения анизотропии флуоресценции наблюдаются для липидных производных DOX в липосомах — вплоть до значения 0.29 для конъюгата DOX-Ole в липидном бислое из POPC. В этом случае подвижность остатка доксорубина приближается к анизотропии полностью неподвижной молекулы —  $r_0$  (табл. 1).

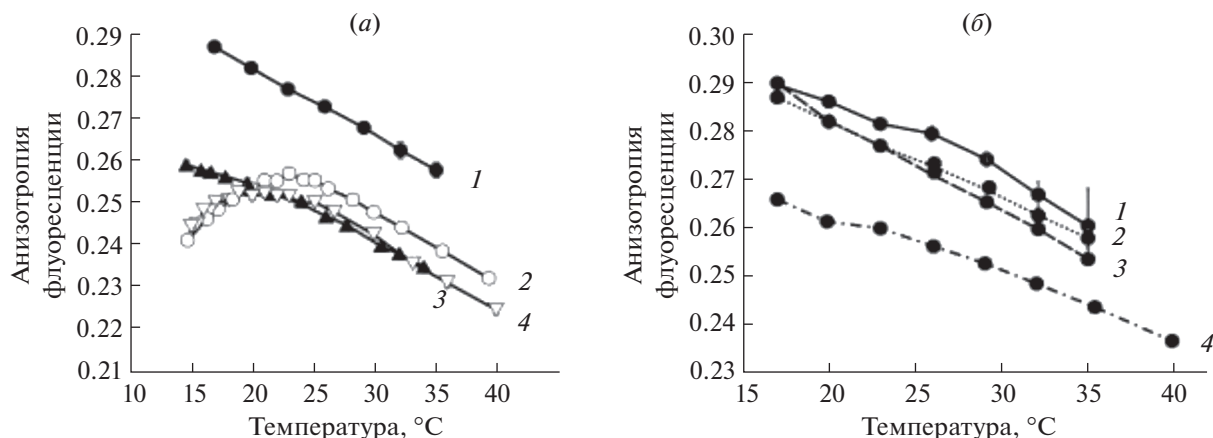
Изменение значений анизотропии флуоресценции  $r$  при нагревании позволяет судить об изменении подвижности агликона DOX в липидном бислое: чем выше подвижность, тем ниже анизотропия. В свою очередь, подвижность молекулы в бислое определяется контактами с окружающими молекулами, фазовым состоянием бислоя (жидкокристаллическая либо гелевая фаза), а также возможным взаимодействием с другими молекулами флуорофора (образование димеров). Для измерений были выбраны фосфолипиды, образующие бислои с существенно различающимися температурами фазовых переходов  $T_m$ : POPC ( $T_m -2^\circ\text{C}$ ) и DMPC ( $T_m +24^\circ\text{C}$ ) [19]. Анизотропия интактного DOX в PBS линейно убывает от 0.08 до 0.05 при нагревании от 16 до  $40^\circ\text{C}$ . В присутствии липосом (из DMPC) значения  $r$  доксорубина увеличиваются до 0.14 ( $16^\circ\text{C}$ ) и 0.10 ( $40^\circ\text{C}$ ).

Анизотропия DOX-DG и DOX-Ole в липидных бислоях может достигать высоких значений, что свидетельствует в пользу прочного удерживания пролекарств в мембране (рис. 2a). Для большинства мембранных зондов значения анизотропии гораздо ниже, например, для фосфатидилхоли-

на, несущего BODIPY-группу при  $-C^\omega$  ацильного остатка в *sn*-2-положении, в бислое из DMPC  $r=0.2$  при  $17^\circ\text{C}$  [20]. Высокие значения  $r_{\text{DOX}}$  можно объяснить образованием водородных связей между остатком DOX конъюгатов и полярными группами липидов.

В липосомах POPC анизотропия обоих производных монотонно уменьшается при нагревании, процесс осуществляется в жидкокристаллической фазе. Однако в случае липосом DMPC кривые имеют максимум при  $\sim 24^\circ\text{C}$ . Мы предполагаем, что уменьшение значений  $r$  при понижении температуры ниже  $T_m$  может быть вызвано димеризацией остатков DOX в составе липофильных конъюгатов в бислое. Известно, что доксорубин склонен к самоассоциации в водных растворах, и недавно показано, что внутренняя анизотропия его димеров равна  $-0.1$  [18]. То есть увеличение доли димеров в системе снижает суммарную анизотропию флуоресценции DOX. Тогда увеличение анизотропии при нагревании ниже температуры фазового перехода в бислое из DMPC соответствует разрушению димеров DOX-Ole или DOX-DG. Образованием димеров объясняется также значительное падение анизотропии флуоресценции, наблюдаемое на примере DOX-Ole при увеличении его концентрации в бислое до 3% (рис. 2б).

Показано [21], что в растворе DOX образует два типа димеров — с параллельной и антипараллельной ориентацией в плоскости ароматических колец. Ранее [17] мы получали 100-нм липосомы, нагруженные DOX-DG, с помощью метода экстракции, в результате которого удается сформировать преимущественно моноламеллярные везикулы [22]. Применение такой методики в случае DOX-Ole не дало результата, как уже упоминалось во “Введении”. В данной работе для получения липосом мы использовали ультразвуковую дезинтеграцию, поэтому присутствие значительного пула мультиламеллярных везикул весьма вероятно. Следовательно, вполне возможно обра-



**Рис. 2.** Температурные зависимости анизотропии флуоресценции (а): 1.5% DOX-Ole (1, 2) и 1.5% DOX-DG (3, 4) в бислоях из POPC (1, 3) или DMPC (2, 4) и (б) зависимость анизотропии флуоресценции DOX-Ole от его содержания в бислое липосом из POPC (%): 0.375 (1), 1.5 (2), 0.75 (3), 3.0 (4). Приведены средние значения  $\pm$ SE измерений.

зование как антипараллельных, так и параллельных (более устойчивых) димеров DOX за счет димеризации молекул конъюгатов, находящихся в соседних бислоях. Такие димеры, по-видимому, могут возникать уже на начальной стадии получения липосом — при образовании гигантских мультиламеллярных везикул во время гидратации липидной пленки.

#### Молекулярная динамика

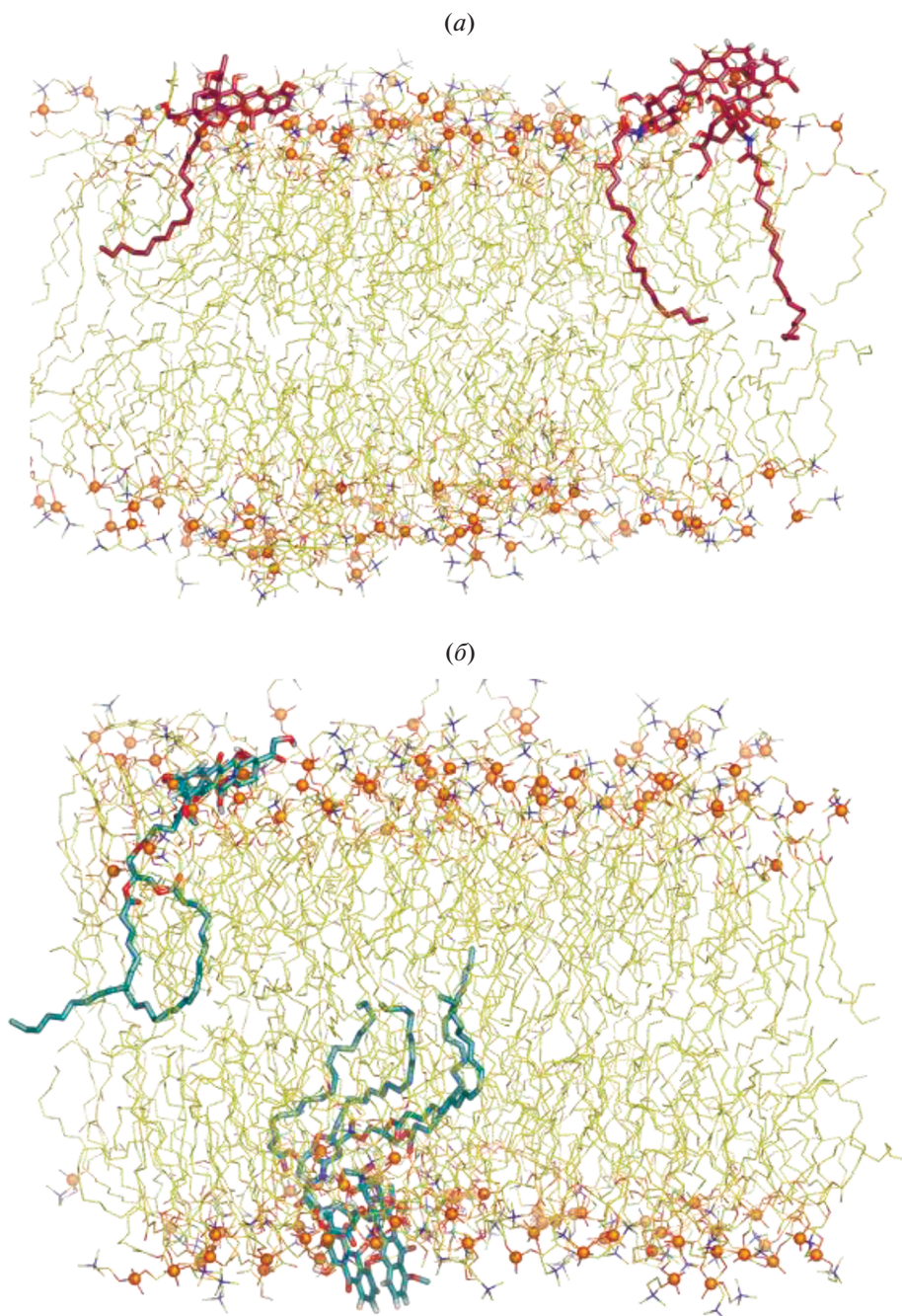
Чтобы изучить поведение производных доксорубина в липидном бислое, мы провели расчеты молекулярной динамики (МД) модельных систем, в которых основой бислоя является POPC, при этом в каждый монослой помещали по шесть молекул DOX-DG или DOX-Ole. Целью данных расчетов была оценка поведения этих молекул в липидном бислое, для чего достаточно системы выбранного размера и длительности траектории 50 нс. За это время расчета все основные параметры (толщина бислоя, площадь на одну молекулу липида и параметры порядка ацильных цепей POPC) приходили к равновесным значениям (см. эксперимент. часть). Сходная схема расчета ранее использовалась при моделировании различных однокомпонентных бислоев [23], а также при тестировании силовых полей для МД-расчетов липидных систем [24]. Для набора более качественной статистики все расчеты были повторены трижды.

Расчеты показали, что гидрофобные хвосты DOX-DG/DOX-Ole лежат в области неполярных ацильных цепей POPC, а агликон доксорубина (головка) “плавает” на границе раздела фаз бислоя–вода (рис. 3). При этом головка DOX-DG в среднем расположена “выше” (дальше от центра бислоя), чем головка DOX-Ole (см. профили плотности на рис. 4а). В соответствии с этой кар-

тиной, остатки DOX-DG имеют большую доступность растворителю (воде) и формируют больше водородных связей с молекулами воды (за исключением остатка углевода) (рис. 4б). Эти результаты подтверждают, что молекулы DOX-Ole сильнее взаимодействуют с бислоем и ограничены в подвижности (по сравнению с диглицеридным конъюгатом), в силу чего анизотропия флуоресценции для них выше.

Анализ водородных связей, возникающих между производными доксорубина и фосфолипидами, показал, что наибольшее их число образует агликон DOX (рис. 4в). При этом агликон чаще всего образует водородные связи с фосфатными группами POPC и реже — с глицериновыми. Интересно, что DOX-Ole образует заметно больше водородных связей по сравнению с DOX-DG (рис. 4в). Очевидно, именно эта особенность DOX-Ole приводит к большей анизотропии флуоресценции (таблица и рис. 2).

Большое число водородных связей агликона DOX с фосфатными группами липидов приводит к тому, что остаток доксорубина в липофильных производных оказывается расположен параллельно поверхности бислоя. Причем в случае DOX-Ole (больше водородных связей) вероятность найти агликон в этом положении выше. Данное наблюдение подтверждается распределением углов наклона остатка доксорубина по отношению к нормали к мембране: в случае DOX-Ole это более узкий пик вблизи  $90^\circ$  (агликон лежит в плоскости мембраны), чем в случае DOX-DG (рис. 4з), что подчеркивает более сильное взаимодействие с бислоем головки DOX-Ole и, следовательно, более высокую анизотропию флуоресценции, что и было измерено в эксперименте.

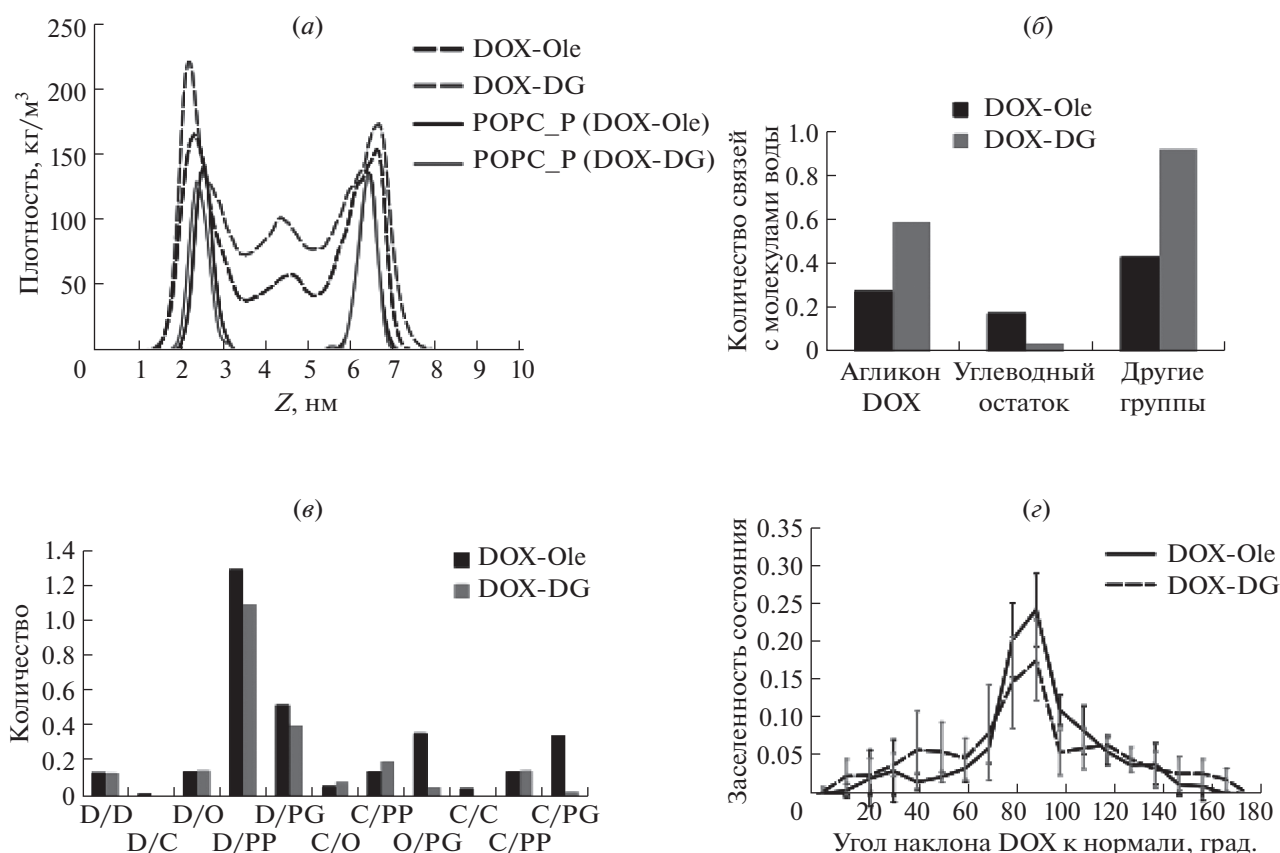


**Рис. 3.** Фрагменты молекулярной динамики DOX-Ole (а) и DOX-DG (б) в бислое POPC. Фосфатные группы представлены сферами, углеродные связи — линиями. На обоих рисунках слева отражено преимущественное расположение остатка DOX в составе молекул пролекарств, а справа — кластеры фрагментов DOX.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы показывают, что подвижность производных доксорубина в бислое липосом ограничена не только латеральной диффузией липидов, но и образованием водородных связей между агликоном DOX и фосфатными группами липидов. Кроме того, молекулы липофильных конъюгатов DOX склонны к кластеризации в мембране липосом. При этом

олеоильные остатки вытягиваются вдоль нормали к поверхности мембраны, приблизительно параллельно углеводородным цепям липидов, поскольку в такой конфигурации минимально возмущение упаковки ацильных цепей. Обнаруженные различия в свойствах диолеилглицеридного и олеоильного производных доксорубина могут влиять как на возможность их включения в липидный бислой в достаточных (с точки зрения те-



**Рис. 4.** Анализ данных молекулярной динамики. (а) Профили плотности молекул DOX-Ole/DOX-DG и фосфатных групп РОРС (РОРС\_Р) вдоль нормали (Z) бислоя. (б) Количество водородных связей с молекулами воды, образуемых различными частями молекул DOX-Ole и DOX-DG. (в) Среднее по времени количество водородных связей, образованных различными частями пролекарств и липидов. Части молекул, участвующие в образовании Н-связей: D – агликон DOX; C – углеводный остаток; PP – фосфатные группы РОРС; PG – остаток глицерина РОРС; O – другие группы. (г) Ориентация остатка DOX в составе молекул пролекарств относительно бислоя.

рапевтического эффекта) количествах, так и на внутриклеточное высвобождение антибиотика за счет ферментализа.

Ранее мы сравнили *in vitro* внутриклеточный транспорт доксорубина и “жидкофазных” липосом, несущих DOX-DG [17]. Оказалось, что конъюгат задерживается в органеллах опухолевых клеток, что замедляет его проникновение в ядро (основную мишень DOX) по сравнению с самим доксорубином. Наиболее вероятной причиной этого является встраивание липосом в мембраны органелл. Нам пока не известно, насколько сильно, с учетом ограничения подвижности конъюгатов в липидном бислое, замедляется их ферментализ и высвобождение молекулы DOX. В отличие от изучаемых нами липосом, которые эффективно поглощаются опухолевыми клетками, липосомы Doxil® интернализируются с трудом [4, 5]. Недавно профессор Баренхольц (Barenholz), один из главных разработчиков DOXIL’a, предложил следующий механизм действия препарата, основанный на явлении повышенного глутаминолиза и вслед-

ствие этого накоплении аммиака в опухолях [5]: DOX из внутреннего объема липосом, экстравазировавших в опухоль, но не интернализованных клетками, диффундирует наружу против градиента концентрации аммиака (процесс, обратный активной нагрузке липосом), а затем уже поступает в клетки. Следовательно, сравнивать противопухольный эффект различных липосомальных форм доксорубина имеет смысл только в экспериментах *in vivo*, где суммируется действие физиологических барьеров как на тканевом, так и на (суб)клеточном уровне.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Синтезы *rac*-1,2-диолеил-3-[доксорубин-*N*-сукцинил-*N'*-(3-аминопропионил)]глицерина (DOX-DG) и *N*-олеилоксиацетилдоксорубина (DOX-Ole) будут описаны в отдельной статье. Использовали доксорубин (DOX) от Лэнс-Фарма (Россия), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицерофосфохолин (РОРС) и 1,2-ди-

миристоил-*sn*-глицерофосфохолин (DMPC) фирмы “Avanti Polar Lipids” (США). Растворители очищали стандартными методами; упаривания проводили в вакууме при температурах не выше 40°C. Готовили фосфатно-солевой буфер PBS, pH 7.05 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 г/л; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.15 г/л; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0 г/л; KCl, 0.2 г/л; NaCl, 8.0 г/л).

**Получение липосомальных дисперсий.** Дисперсии состава POPC(DMPC) – DOX-Ole/DOX-DG, 97 : 0.38–3 (моль/моль), 5 мкМ по пролекарству, получали следующим образом: смесь липидов в требуемых соотношениях упаривали в круглодонных пробирках из растворов в хлороформе на роторном испарителе; липидные пленки высушивали в течение 40 мин при 7 Па (лиофильная сушилка “ИНЕЙ-4”; ИБП РАН, Россия), затем гидратировали PBS, подвергая 10-кратной процедуре замораживания/оттаивания (жидкий азот/+40°C), и обрабатывали на ультразвуковой бане (35 кГц; Сапфир, Россия) при комнатной температуре (или при нагревании до 35°C в случае дисперсий DMPC) в течение 30 мин. Концентрацию дисперсий липосом по DOX определяли спектрофлуориметрически, разбавляя аликвоты в 10 раз метанолом или подкисленным этанолом. Дисперсии липосом хранили при 4°C не более 2 недель.

**Флуоресцентная спектроскопия.** Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi F4000 (Япония) в зеркальных кюветках (ООО “Фотон-Век”, г. Пушкино) объемом 300 мкл при длине волны возбуждения флуоресценции 475 нм и ширине щели 10 нм в интервале длин волн 595–700 нм при ширине щели 10 нм; скорость 120 нм/мин.

Для флуоресцентных измерений готовили 5 мкМ раствор доксорубина в PBS. Для определения анизотропии флуоресценции DOX в присутствии DMPC 50 мкл раствора DOX добавляли к 250 мкл 15 мМ дисперсии DMPC и обрабатывали на ультразвуковой бане в течение 30 мин при 35°C. Температурные зависимости анизотропии флуоресценции DOX-DG/DOX-Ole в составе липосомальных дисперсий регистрировали с помощью жидкостного термостата CTE-22A Coolnics Circulator (Yamato-Komatsu, Япония). Рассеяние учитывали, снимая спектры флуоресценции дисперсии DMPC в отсутствие DOX.

Анизотропию флуоресценции определяли согласно выражению:

$$r = (I_{vv} - G \times I_{vh}) / (I_{vv} + 2G \times I_{vh}), \quad G = I_{hv} / I_{hh},$$

где  $I_{vv}$ ,  $I_{vh}$ ,  $I_{hh}$  и  $I_{hv}$  – интенсивности флуоресценции, полученные при вертикальной (v) или горизонтальной (h) поляризации возбуждающего и испускаемого света.

**Молекулярное моделирование.** Молекулярная динамика (МД) DOX-DG/DOX-Ole в бислое POPC была проведена с помощью программы GROMACS в силовом поле Gromos 43a2x. Система: 58 молекул POPC, 6 молекул DOX-Ole или DOX-DG в каждом монослое, около 5300 молекул воды. Размер ячейки: 6 × 6 × 8.8 нм<sup>3</sup>. Длительность траекторий МД: 50 нс × 3 для каждой системы (всего 6 траекторий). Температура: 315 К (термостат V-rescale). Давление: 1 бар (баростат Берендсена). Учет электростатических взаимодействий: метод PME (Particle Mesh Ewald). Анализ МД осуществляли, вычисляя следующие характеристики: среднюю площадь на молекулу липида; характерную толщину бислоев и профили плотности атомов; водородные связи и сольватацию; параметры порядка ацильных цепей; наклон “головки” доксорубина; гидрофобные параметры экспонированных групп. Анализ водородных связей осуществляли с помощью стандартной утилиты GROMACS g\_hbond, позволяющей оценивать факт образования таких связей между парами донор/акцептор, а также измерять время жизни водородных связей. Для анализа мы группировали доноры и акцепторы следующим образом: агликон DOX (D), углеводный остаток (C), фосфатные группы POPC (PP), остаток глицерина POPC (PG), другие группы (O).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-79-20440), а также программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (А.О.Ч., Р.Г.Е.). Анализ данных МД был выполнен при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-04-00578). Авторы благодарны суперкомпьютерному центру “Политехнический” при СПбГУ за предоставленные вычислительные ресурсы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Allen T.M., Cullis P.R. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013. V. 65. P. 36–48.
2. Barenholz Y. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 117–134.
3. Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A. // *J. Control. Release.* 2009. V. 139. P. 73–80.
4. Jung S.H., Seong H., Cho S.H., Jeong K.S., Shin B.C. // *Int. J. Pharmaceutics.* 2009. V. 382. P. 254–261.
5. Silverman L., Barenholz Y. // *Nanomedicine.* 2015. V. 11. P. 1841–1850.
6. Chhikara B.S., Mandal D., Nicole St.J., Parang K. // *Eur. J. Med. Chem.* 2011. V. 46. P. 2037–2042.
7. Chhikara B.S., Mandal D., Parang K.J. // *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 1500–1510.



8. Maksimenko A., Dosio F., Mouglin J., Ferrero A., Wack S., Reddy L.H., Weyn A.A., Lepeltier E., Bourgaux C., Stella B., Cattell L., Couvreur P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. E217–226.
9. Song Y.F., Liu D.Z., Cheng Y., Liu M., Ye W.L., Zhang B.L., Liu X.Y., Zhou S.Y. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 16125. doi 10.1038/srep16125
10. Liederer B.M., Borchardt R.T. // J. Pharm. Sci. 2006. V. 95. P. 1177–1195.
11. Mura S., Bui D.T., Couvreur P., Nicolas J. // J. Control. Release. 2015. V. 208. P. 25–41.
12. Irby D., Du C.G., Li F. // Mol. Pharmaceutics. 2017. V. 14. P. 1325–1338.
13. Kapoor B., Gupta R., Singh S.K., Gulati M., Singh S. // Adv. Coll. Interface Sci. 2018. V. 253. P. 35–65.
14. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. // Рос. нанотехнол. 2008. Т. 3. № 3–4. С. 162–172. [Vodovozova E.L., Kuznetsova N.R., Kadykov V.A., Khutsyan S.S., Gaenko G.P., Molotkovskii J.G. // Nanotechnologies in Russia. 2008. V. 3(3–4). P. 228–239.]
15. Kuznetsova N.R., Stepanova E.V., Peretolchina N.M., Khochenkov D.A., Boldyrev I.A., Bovin N.V., Vodovozova E.L. // J. Drug Target. 2014. V. 22. P. 242–250.
16. Alekseeva A.S., Moiseeva E.V., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Singin A.S., Budko A.P., Shprakh Z.S., Molotkovskiy J.G., Vodovozova E.L. // Int. J. Nanomedicine. 2017. V. 15. P. 3735–3749.
17. Кузнецова Н.Р., Свиричевская Е.В., Скрипник И.В., Зарудная Е.Н., Бенке А.Н., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г., Водовозова Е.Л. // Биол. мембраны. 2012. Т. 29. № 5. С. 329–339. [Kuznetsova N.R., Svirshchevska-ya E.V., Skripnik I.V., Zarudnaya E.N., Benke A.N., Gaenko G.P., Molotkovskii Yu.G., Vodovozova E.L. // Biochemistry (Moscow) Suppl. Series A: Membrane and Cell Biol. 2013. V. 7(1). P. 12–20.]
18. Changenet-Barret P., Gustavsson T., Markovitsi D., Manet I., Monti S. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2013. V. 15. P. 2937–2944.
19. Silvius J.R. // Lipid-Protein Interactions. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1982.
20. Омельков А.В., Павлова Ю.Б., Болдырев И.А., Молотковский Ю.Г. // Биоорган. химия. 2007. Т. 33. № 5. С. 544–549. [Omel'kov A.V., Pavlova Yu.B., Boldyrev I.A., Molotkovskii Ju.G. // Bioorg. Khim. 2007. V. 33(5). P. 544–549.]
21. Agrawal P., Barthwal S.K., Barthwal R. // Eur. J. Med. Chem. 2009. V. 44. P. 1437–1451.
22. Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 812(1). P. 55–65.
23. Polyansky A.A., Volynsky P.E., Nolde D.E., Arseniev A.S., Efremov R.G. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109(31). P. 15052–15059.
24. Jämbeck J.P.M., Lyubartsev A.P. // J. Phys. Chem. B. 2012. V. 116(10). P. 3164–3179.

## Behavior of Doxorubicin Lipophilic Conjugates in Lipid Bilayer of Liposomes

A. S. Alekseeva\*, A. O. Chugunov\*,\*\*, P. E. Volynsky\*, N. R. Onishchenko\*, J. G. Molotkovsky\*, R. G. Efremov\*,\*\*,\*\*\*, I. A. Boldyrev\*,\*\*\*\*, and E. L. Vodovozova\*,#

#Phone: +7 (495) 330-66-10; e-mail: elvod@lipids.ibch.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Higher School of Economics, Moscow, 101000 Russia

\*\*\*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, 141700 Russia

\*\*\*\*National University of Science and Technology MISiS, Moscow, 119049 Russia

Liposomal formulations containing water-soluble drugs in the form of lipophilic prodrugs in their lipid bilayer are of considerable interest. Earlier, we have synthesized dioleoylglyceride and oleoyl conjugates of doxorubicin designed for incorporation into fluid-phase liposomal bilayers. Here, we investigated the behavior of the lipid conjugates in bilayers prepared of palmitoyloleoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylcholine using fluorescence methods and molecular modeling. As expected, the conjugates' mobility was limited in the bilayer; mobility of doxorubicin aglycone was found to be further limited by the hydrogen bonds it forms with lipid phosphate groups. In the liposome membrane, lipophilic conjugates also tend to form clusters through interaction of doxorubicin moieties. Oleoyl chains stretch parallel to the acyl residues of phospholipids. Due to the formation of more hydrogen bonds, the oleoyl conjugate interacts with the bilayer stronger than the dioleoylglyceride counterpart. These properties of the doxorubicin conjugates can affect both the possibility of their incorporation into the lipid bilayer (from the therapeutic effect point of view) and intracellular release of the antibiotic drug by means of enzymolysis.

*Keywords: doxorubicin, liposomes, lipophilic prodrugs, lipid bilayer, fluorescence anisotropy, molecular dynamics*