

©Коллектив авторов

ДЕЙСТВИЕ ЛИПИДНОГО ПРОИЗВОДНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЛЕКАРСТВА САРКОЛИЗИНА, ВКЛЮЧЁННОГО В ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, НА ОПУХОЛИ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

Ю.А. Терешкина*, Т.И. Торховская, М.А. Санжаков, Л.В. Кострюкова, Ю.Ю. Худоклинова, Е.Г. Тихонова

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: burova13@gmail.com

С целью улучшения терапевтических свойств противоопухолевого агента сарколизина ранее нами была разработана и охарактеризована лекарственная форма, представляющая собой его сложноэфирный конъюгат с деканолом, встроенный в ультрамалые фосфолипидные наночастицы менее 30 нм (Сарколизин-НФ). В работе исследовали действие этой композиции в условиях *in vivo* в сравнении со свободной субстанцией сарколизина. При внутривенном введении её мышам было показано улучшение фармакокинетических параметров сарколизина, связанных с большим (на 22%) его первоначальным уровнем в крови и с пролонгированной циркуляцией, что наблюдалось, в том числе, на мышах с опухолью Р388. При этом количество и длительность нахождения сарколизина в ткани опухоли были существенно выше (более чем в два раза) по сравнению со свободной субстанцией. На мышах с тремя видами опухолей (лимфолейкоз Р388, лимфолейкоз L1210 и аденокарцинома молочной железы Са755) показано преимущественное противоопухолевое действие, проявлявшееся в достоверно большем торможении роста опухолей и увеличении продолжительности жизни животных. Максимальное торможение роста опухоли при лечении Сарколизин-НФ в дозе 8,4 мг/кг отмечено для лимфолейкоза L1210 и аденокарциномы молочной железы Са755 (в сравнении с субстанцией выше более чем на 24% и 17% соответственно). При дозе препарата 10 мг/кг различия в продолжительности жизни животных были выявлены достоверно и составили 25% и 17,4% для лимфолейкозов Р388 и L1210 соответственно и 11% для аденокарциномы Са755. При внутривенном введении крысам острая токсичность Сарколизина-НФ (значение LD₅₀) была в 2-3 раза ниже, чем LD₅₀ для коммерческих препаратов свободного сарколизина (Мелфалана и Алкерана), что свидетельствует о меньшей токсичности препарата Сарколизин-НФ.

Ключевые слова: сарколизин; липидное производное; фосфолипидные наночастицы; онкология; миеломная болезнь

DOI: 10.18097/PBMC20216706491

ВВЕДЕНИЕ

Высокий интерес к системам доставки лекарств обусловлен возможностями уменьшения при этом негативного действия используемых противоопухолевых препаратов на здоровые клетки и ткани. Одним из широко применяемых в химиотерапии препаратов является алкилирующее средство сарколизин (4-[бис(2-хлорэтил)амино]-L-фенилаланин) или его стерический L-изомер (энантиомер) мелфалан. Сарколизин (мелфалан) обладает широким спектром противоопухолевой активности и используется при лечении множественной миеломы, рака яичников, рака молочной железы и нейробластомы [1]. Его цитотоксическое действие обусловлено алкилированием структурных элементов ДНК (пуринов, пиримидинов) и РНК (в меньшей степени), в результате чего нарушается стабильность, вязкость, целостность нитей ДНК и РНК. Также блокируется ряд метаболических реакций, нарушается митотическое деление и репликация клеток. Особой чувствительностью к алкилирующим веществам обладают ядра клеток гиперплазированных (опухолевых) тканей и лимфоидной ткани (рис. 1) [2]. Вместе с тем, сарколизин имеет ряд существенных недостатков, характерных для многих противоопухолевых препаратов, обусловленных отсутствием специфичности к опухолевым клеткам [1, 3, 4]. Имеются сообщения о его побочных

эффектах — гемотоксичности, гепатотоксичности, кардиотоксичности, алопеции, аллергических реакциях [4, 5], гемолитической активности [6, 7]. Основным токсическим проявлением препарата является угнетение костномозгового кроветворения — миелопоза. Нарушения выявляются и со стороны иммунологических реакций: уменьшается содержание лимфоцитов, обнаруживаются морфологические изменения макрофагов. Известно, что сарколизин угнетает индуктивную фазу первичного иммунного ответа [8]. Применение мелфалана (сарколизина) затрудняется также и за счёт его низкой растворимости, а также гидролитической нестабильности в водной среде с замещением остатков Cl на гидроксильные группы, что снижает алкилирующую способность препарата [4].

Для преодоления указанных недостатков проводятся исследования по разработке различных модифицированных форм препарата. Одним из подходов является конструирование “пролекарства”, то есть производного с присоединением ряда химических групп, отщепляющихся после введения в организм в результате химического или ферментативного гидролиза. Применение такого подхода позволяет добиться пролонгированного высвобождения лекарства со снижением побочного действия на здоровые клетки. В настоящее время известно несколько



Рисунок 1. Схематическое изображение цитотоксического действия сарколизина на клетки гиперплазированной (опухолевой) ткани.

производных препарата сарколизин (мелфалан), которые находятся на разных этапах исследования: порфирин-поли(амидоамин) конъюгаты [1], конъюгаты с О-карбоксиметил-хитозаном в сочетании с различными аминокислотными спейсерами (включая глицин, 1-фенилаланин, 1-лейцин и 1-пролин) [9], мелфлуфен (этиловый эфир мелфалана и флуфенамида, ранее называвшийся J1) [10]. Получены также химические модификации мелфалана по двум функциональным группам: карбоксильной и аминогруппе (метилловый и этиловый эфиры мелфалана, модифицированные морфолиновым кольцом или дипропиленовой цепью [11]).

В работах Водовозовой с соавт. был получен конъюгат мелфалана с синтезированным авторами диглицеридом с последующим включением его в фосфолипидные липосомы. Показано его выраженное противоопухолевое действие на моделях опухолей [4, 12]. Такой подход с использованием фосфолипидов в качестве материала для наноконтейнеров позволяет получить высокоэффективный, обладающий меньшей токсичностью препарат [13]. В Институте биомедицинской химии коллективом авторов был синтезирован сложноэфирный конъюгат сарколизина с длинноцепочечным спиртом деканолом [14]. Осуществлено встраивание полученного липидного производного сарколизина (ЛПС) в ультрамалые фосфолипидные наночастицы с диаметром менее 30 нм. Получена нанофосфолипидная композиция с условным названием Сарколизин-НФ [14]. При инкубации её с препаратами крови *in vitro* наблюдалось относительно быстрое (в течение 20-30 мин) превращение ЛПС в свободный сарколизин. По всей видимости, это превращение было обусловлено действием

ферментов форменных элементов крови [14], так как при инкубации подобной системы с плазмой такого изменения не происходило [12].

Целью настоящей работы было исследование фармакокинетики сарколизина при введении мышам в составе разработанной наносистемы, а также динамики накопления лекарства в ткани опухоли и противоопухолевого действия на трёх моделях опухолей. Для оценки риска побочных эффектов также исследовали степень острой токсичности.

МЕТОДИКА

Материалы и реактивы

Фармакологическая субстанция сарколизина (2-амино-3-[4-[бис(2-хлорэтил)амино]фенил]пропионовая кислота) 98% ("Кемикал Лайн", Россия); лиофилизированная лекарственная композиция Сарколизина-НФ, приготовленная с предварительным синтезом ЛПС путём присоединения деканола, как описано ранее [14]; 0,9% раствор NaCl ("Гротекс", Россия). Для приготовления растворов сарколизин-содержащих препаратов использовали воду для инъекций ("Ист-фарм", Россия). Концентрация растворов по сарколизину составляла 5 мг/мл.

Животные и условия их содержания

Для изучения противоопухолевой активности сарколизин-содержащих препаратов на двухнедельных мышах линии DBF/2 использовали экспериментальные модели перевиваемых опухолей: лимфолейкоз P388, лимфолейкоз L1210, аденокарцинома молочной железы мышей Ca755. Фармакокинетику сарколизина и его липидного производного исследовали в экспериментах на беспородных мышах. Острую

токсичность исследовали на белых беспородных мышах и крысах породы Wistar. Источник животных — питомник Филиал “Андреевка” Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства. До начала исследования животных помещали в отдельные комнаты на период адаптации (14 дней). Условия содержания животных соответствовали стандартным требованиям [15]. Для экспериментов животных случайно распределяли по группам, согласно среднему показателю массы тела (отклонение $\leq 10\%$ от средней массы), в каждой группе было по 10 животных. По окончании эксперимента проводили эвтаназию путём передозировки этиловым эфиром с последующим обескровливанием.

Изучение противоопухолевой активности

Перевивку опухолей животным проводили согласно руководству по проведению доклинических исследований [15]. Первое введение препарата производили через 24 ч после перевивки опухоли. В течение 7 дней через день (всего 4 раза) в хвостовую вену мышей вводили сравниваемые препараты в виде растворов в дозах 8,4 мг/кг и 10 мг/кг (в пересчёте на субстанцию сарколизина). Контролируемые параметры: увеличение продолжительности жизни (УПЖ) и торможение роста опухоли (ТРО). Наблюдение за животными продолжали в течение 30 дней после введения опухолевых клеток. Фиксировали продолжительность жизни животных для каждой группы (средняя продолжительность жизни животных с опухолью без лечения — 17-21 день). Показатель ТРО рассчитывали на 14 сутки после окончания лечения по формуле:

$$\text{ТРО}\% = (V_{\text{контр}} - V_{\text{опыт}}) / V_{\text{контр}} \times 100,$$

где V — средний объём опухоли (см^3) в опытной и контрольной группах соответственно.

Исследование фармакокинетических параметров

Сарколизин-НФ и субстанцию сарколизина вводили мышам однократно внутривенно в дозе 8,4 мг/кг (в пересчёте на субстанцию сарколизина). Через 15 мин, 30 мин, 60 мин, 120 мин, 240 мин и 24 ч после введения препаратов производили забор крови из хвостовой вены в пробирку с ЭДТА (для каждой временной точки кровь отбирали у 5 животных). Полученные образцы обрабатывали и анализировали как описано ранее [14]: экстрагировали 9-кратным избытком метанола, интенсивно перемешивая в течение 2-3 мин, центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810 R (“Eppendorf”, Германия), ротор FA-45-30-11 в течение 10 мин при 10000 об/мин. Пробоподготовку и анализ образцов проводили с использованием HPLC-MS на приборе Agilent Technologies 1100 Series Liquid Chromatograph Mass Spectrometer (“Agilent Technologies”, США) [14].

Фармакокинетические параметры рассчитывали согласно [16] на основании экспериментальных результатов (концентрация — время) с использованием программы для расчёта

параметров фармакокинетических кривых Borgia (интернет-версия 1.03) и математического аппарата Microsoft Excel.

Накопление сарколизина и ЛПС в опухолях

Исследование накопления сарколизина и ЛПС в опухолях с параллельным анализом изменений в образцах крови проводили на мышах линии DBF/2 с лимфолейкозом P388. Данный лейкоз характеризуется агрессивным течением, на 5-6 сутки в месте трансплантации лейкозных клеток у мышей наблюдался активный рост опухоли. Животным однократно вводили исследуемые препараты сарколизина в дозе 8,4 мг/кг и отбирали образцы опухолей и крови через 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч. Ткань опухоли предварительно гомогенизировали для извлечения анализируемого соединения. К взвешенным образцам опухолевой ткани (100 мг) добавляли 300 мкл воды и гомогенизировали с использованием сверхзвукового Sonorex digital 10P (“Bandelin”, Германия). Затем к 50 мкл гомогената добавляли 9-кратный избыток метанола, интенсивно перемешивая в течение 2-3 мин, и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5810 R, ротор FA-45-30-11 в течение 15 мин при 4°C и 10000 об/мин. Анализ образцов проводили с использованием HPLC-MS, согласно ранее проводимым процедурам [14] как описано выше.

Острая токсичность

Острую токсичность оценивали на белых беспородных мышах (массой 25 ± 3 г) и крысах-самцах породы Wistar (массой 250 ± 50 г) путём определения величины LD_{50} согласно [16]. Животным вводили Сарколизин-НФ в виде раствора в хвостовую вену в дозах 10 мг/кг, 15 мг/кг, 20 мг/кг, 25 мг/кг и 30 мг/кг (в пересчёте на субстанцию сарколизина). Количество животных в каждой группе составляло по 10 особей для мышей и по 5 особей для крыс. Наблюдения вели в течение 14 дней.

Обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили по критерию Стьюдента. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. В таблицах и на рисунках указаны статистически достоверные значения относительно группы контрольных животных при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предыдущем исследовании [14] нами было проведено подробное изучение взаимодействия Сарколизина-НФ с кровью *in vitro*. Для расширения информации о действии наноформы Сарколизина перед проведением экспериментов на животных с опухолями представлялось целесообразным провести детальное рассмотрение и расчёт фармакокинетических параметров этой композиции при внутривенном введении в эксперименте на здоровых животных.

Исследование фармакокинетических параметров

Изучение параметров фармакокинетики сарколизина при внутривенном однократном введении препаратов (Сарколизин-НФ и субстанция сарколизина) проводили на мышах в дозе 8,4 мг/кг с последующим определением в течение нескольких часов его уровня в крови (рис. 2а). Оценивали также концентрацию ЛПС в образцах крови (рис. 2б).

Как видно из рисунка 2а, сарколизин присутствовал в крови на протяжении 2 ч после введения мышам как исследуемой лекарственной композиции (Сарколизин-НФ), так и субстанции. При этом для обеих форм препарата профили концентраций сарколизина были сходны. Время достижения максимальной его концентрации в крови для обоих препаратов составляло 15 мин, однако для Сарколизина-НФ она была выше на 22%, чем при введении субстанции ($p < 0,05$).

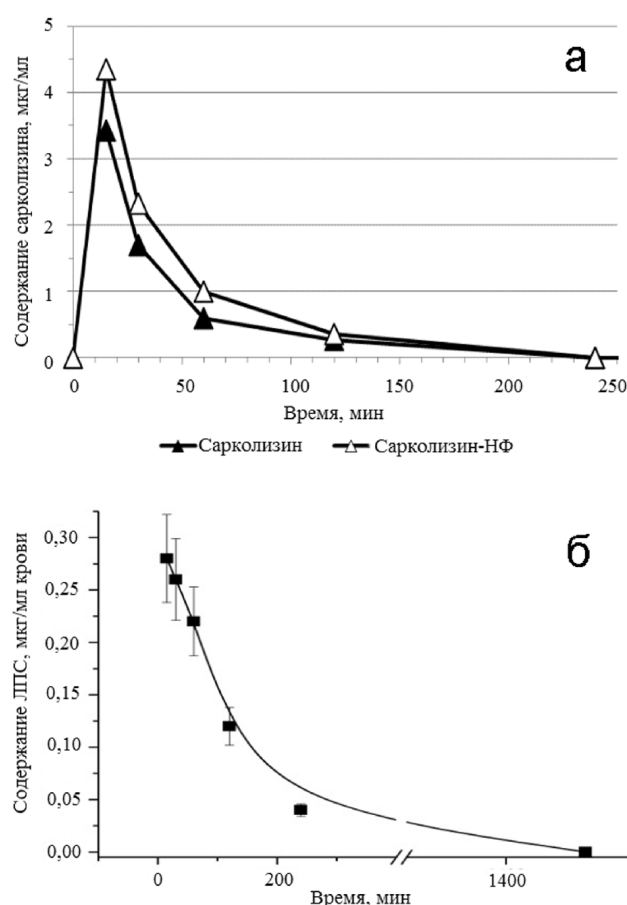


Рисунок 2. Содержание сарколизина (а) и ЛПС (б) в крови мышей после внутривенного введения Сарколизина-НФ или субстанции свободного сарколизина (на рисунке «а» разброс показаний не превышал 10% и был сопоставим с размером символа). Доза по сарколизину 8,4 мг/кг.

На рисунке 2б приведена диаграмма изменения содержания в крови мышей ЛПС после введения препарата Сарколизин-НФ. Как видно, содержание ЛПС в течение всего эксперимента было значительно ниже, чем свободного. В максимальной для уровня сарколизина точке (15 мин) содержание ЛПС (менее 0,3 мкг/мл) составляло только 6,5% от общей (то есть в сумме с сарколизинном, рис. 2а) концентрации этого лекарственного агента в крови.

В таблице 1 приведены значения некоторых фармакокинетических параметров сарколизина для обеих его форм на основании кривых, приведённых на рисунке 1а, где AUC_t (мкг×мин/мл) — площадь под фармакокинетической кривой “концентрация – время” (area under curve) — рассчитывается от момента введения до t ч; Cl (мл/мин) — общий клиренс — параметр, характеризующий скорость выведения вещества из организма в единицу времени; $T_{1/2}$ (мин) — период полувыведения; k_{el} (мин⁻¹) — константа скорости элиминации — параметр, характеризующий скорость выведения вещества из плазмы крови. Результаты математической обработки экспериментальных данных (табл. 1) имеют в основном близкие значения для обоих препаратов. Вместе с тем, показатели, характеризующие выведение сарколизина из кровотока ($T_{1/2}$, k_{el} и Cl) для Сарколизина-НФ имеют меньшие величины, в частности, значение Cl на 25% ниже. Это подтверждает ранее полученные данные о протекании в крови процесса гидролиза ЛПС [14]. В сочетании с несколько более высоким значением максимальной концентрации (рис. 2а) это приводит к большему значению параметра AUC , суммарно отражающего количество и длительность пребывания лекарства в кровотоке, то есть возможность реализации свойственного препарату терапевтического эффекта. Для Сарколизина-НФ в сравнении с субстанцией сарколизина величина AUC была на 25% выше. Полученные различия свидетельствуют о возможном пролонгированном действии сарколизина, образованного в результате цепи превращений пролекарства (ЛПС) в лекарство при введении Сарколизина-НФ, по сравнению с субстанцией сарколизина.

Для выявления возможного влияния показанных различий на терапевтическую эффективность Сарколизина-НФ были проведены серии сравнительных экспериментов на моделях опухолей у мышей: оценка динамики изменений его содержания в тканях опухолей после однократного введения, а также влияние 7-дневного курса лечения на степень увеличения продолжительности жизни животных и торможение роста опухоли.

Таблица 1. Значения фармакокинетических параметров после внутривенного введения препаратов мышам

Параметр	Сарколизин-НФ	Сарколизин
Период полувыведения, $T_{1/2}$, мин	35,72	37,50
Константа элиминации, k_{el}	0,04613	0,05308
Клиренс, Cl , мл/мин	0,64	0,80
$AUC_{20 \rightarrow \infty}$, мкг×мин/мл	263,5	209,0

Исследование динамики содержания сарколизина в крови у мышей с опухолью и в ткани опухоли

Мышам с инокулированной опухолью лимфолейкоз Р388 вводили однократно внутривенно сравнимые препараты сарколизина. После этого в четырёх временных точках (через 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч) осуществляли забой животных и определяли уровень сарколизина и ЛПС в крови и в образцах опухоли.

Содержание сарколизина в крови мышей с опухолью. На рисунке 3 приведены результаты определения уровня сарколизина и ЛПС в крови мышей с опухолью после введения сравнимых препаратов.

Сравнение рисунка 3а с приведёнными выше фармакокинетическими данными, где к 2 ч различия в уровне сарколизина на фоне высоких концентраций в начале эксперимента (через 15 мин) уже практически незаметны (рис. 2а), показывает, что при более детальном рассмотрении в меньшем масштабе (соответствующем низким концентрациям оставшегося лекарства) различия всё же сохранялись. Для Сарколизина-НФ можно видеть почти в 2,5 раза большее содержание сарколизина через 2 ч ($p < 0,05$), чем после введения свободного сарколизина

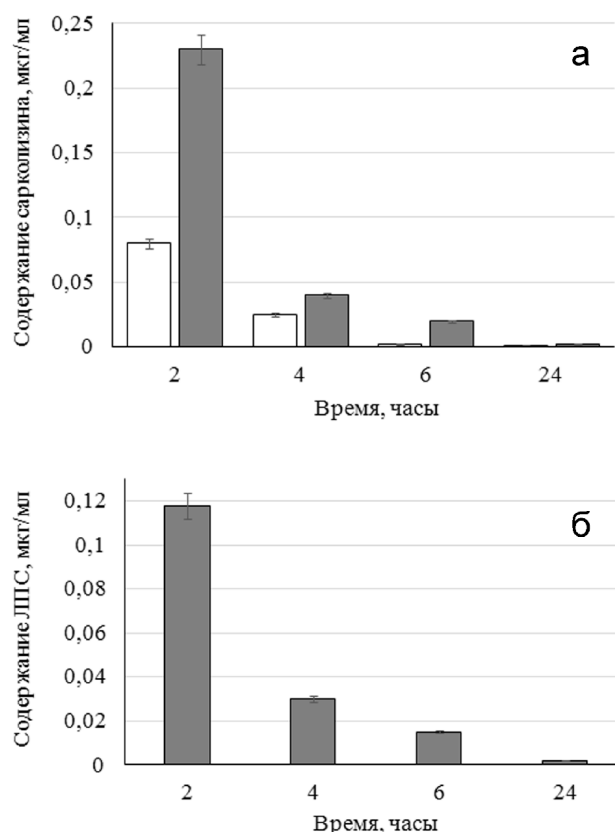


Рисунок 3. Содержание сарколизина (а) и ЛПС (б) в крови мышей линии DBF/2 с инокулированной опухолью лимфолейкоз Р388 в зависимости от времени после внутривенного введения субстанции сарколизина (белые столбцы) и «Сарколизина-НФ» (серые столбцы). Серые столбцы (б) – содержание ЛПС после введения «Сарколизина-НФ», мкг/мл крови. Доза по сарколизину – 8,4 мг/кг.

(0,25 против 0,09 мкг/мл). Через 4 ч различия уменьшались, но, всё же, у животных, получавших Сарколизин-НФ, уровень сарколизина в крови был выше по сравнению с животными, получавшими свободную субстанцию (в среднем на 25-30%, $p < 0,05$). Спустя 6 ч, когда в крови мышей, получавших свободный сарколизин, он уже не обнаруживался, в группе животных, получавших Сарколизин-НФ, он ещё присутствовал, но в небольших количествах. При этом невысокий уровень ЛПС (0,11 мг/мл — меньше половины от показанного на здоровых животных максимального уровня после введения (0,27 мг/мл), рис. 2б) до 2 ч ещё сохранялся, далее интенсивно снижаясь к 6 ч (рис. 3б). Через 24 ч ни сарколизин, ни ЛПС в крови экспериментальных животных уже не обнаруживались.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что сарколизин, введенный в составе препарата Сарколизин-НФ, длительно присутствовал (8 ч или более) в заметных концентрациях в кровотоке, в отличие от введенного свободного сарколизина, элиминирующего значительно раньше. Таким образом, в составе фосфолипидных наночастиц повышается вероятность проникновения лекарства в клетки-мишени.

Содержание сарколизина в опухолевой ткани. В тех же временных точках (через 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч) определяли степень накопления сарколизина в ткани опухоли. Результаты, приведённые на рисунке 4, показывают, что после введения Сарколизина-НФ через 2 ч и 4 ч в ткани опухоли регистрировалось более чем двукратное увеличение содержания сарколизина по сравнению с его уровнем после введения в виде свободной субстанции ($p < 0,05$). Через 6 ч и 24 ч после введения свободного сарколизина в ткани опухоли он уже не обнаруживался, однако ещё присутствовал в опухолях мышей, получавших Сарколизин-НФ. При этом ЛПС в опухолевой ткани не обнаруживалось уже в первой временной точке эксперимента — через 2 ч после введения (данные не приведены). Возможно, его превращение в сарколизин частично происходило в ткани опухоли раньше, после поступления в составе фосфолипидной наночастицы, и в этом эксперименте оно уже не фиксировалось.

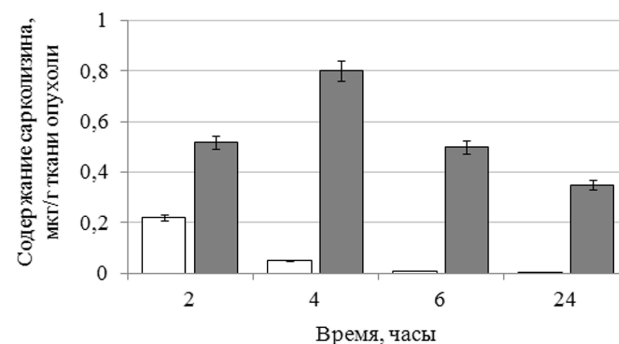


Рисунок 4. Кинетика накопления сарколизина в опухолевой ткани мышей после однократного внутривенного введения сарколизина в виде субстанции (белые столбцы) и в виде ЛПС, включённого фосфолипидные наночастицы (серые столбцы).

Таким образом, внутривенное введение сарколизина животным с опухолью в виде ЛПС, встроенного в фосфолипидные наночастицы, позволяло повысить количество и длительность его циркуляции в крови, что способствовало большему его накоплению в ткани опухоли. По всей вероятности, этому способствовал и эффект повышенной проницаемости и удерживания (EPR, enhanced permeability and retention): для частиц в пределах размеров (≤ 50 нм) происходит экстравазация в ткани опухоли, повышающая накопление в ней встроенного лекарства [17]. Можно предположить также стимулирующее влияние фосфолипидных наночастиц на проникновение (интернализацию) транспортируемого лекарства в опухолевую клетку, отмеченное нами ранее для других включённых в данную наносистему лекарственных противоопухолевых агентов [18]. Представляло интерес выяснить влияние этих изменений на терапевтическую активность сарколизина, что и было проведено нами на следующем этапе работы.

Изучение специфической противоопухолевой активности композиции Сарколизин-НФ

Сравнительное исследование эффективности противоопухолевого действия Сарколизина-НФ и свободной субстанции сарколизина проводили на трёх видах перевитых опухолей у мышей — лимфолейкозе Р388, лимфолейкозе L1210 и аденокарциноме молочной железы Ca755. Препараты вводили в течение 7 дней.

На рисунке 5 представлены данные по продолжительности жизни мышей с тремя моделями опухолей после лечения сравнимыми препаратами (Сарколизин-НФ и сарколизин субстанция) в дозах 8,4 мкг/мл или 10 мкг/мл. Как видно из рисунка 5, оба препарата увеличивали

продолжительность жизни животных по сравнению с контролем (без лечения), особенно для обоих видов лимфолейкозов, однако эффект Сарколизина-НФ был выражен в большей степени. Для Сарколизина-НФ эффект двух используемых доз был сходным, для свободного сарколизина наблюдалась некоторая дозозависимость. Преимущество Сарколизина-НФ более выражено проявлялось при большей дозе (10 мкг/кг) — продолжительность жизни мышей составила 25 и 27 дней для лимфолейкозов Р388 и L1210 соответственно по сравнению с 20 и 23 днями при лечении свободной субстанцией, то есть соответственно на 25% и на 17,4% выше ($p < 0,1$). При этой дозе небольшое, но статистически достоверное различие большей продолжительности жизни после введения Сарколизина-НФ (до 31 дня по сравнению с 28 днями для свободного сарколизина) наблюдалось и на другой опухоли — аденокарциноме молочной железы Ca755.

Другим информативным параметром, характеризующим противоопухолевый эффект в экспериментах на животных, является степень торможения роста опухоли (ТРО) по сравнению с контролем. На рисунке 6 для описанных выше экспериментов на трёх видах опухолей приведены проценты ТРО при введении Сарколизина-НФ или свободной субстанции. Как видно из рисунка 6, для всех трёх видов опухолей действие Сарколизина-НФ было более выраженным: торможение роста опухоли было достоверно выше, чем после введения субстанции свободного сарколизина. Максимальное проявление данного эффекта отмечалось в отношении лимфолейкоза L1210 и аденокарциномы молочной железы мышей Ca755 при введении Сарколизина-НФ в дозе 8,4 мкг/кг (выше в сравнении с субстанцией более чем на 24% и 17% соответственно).

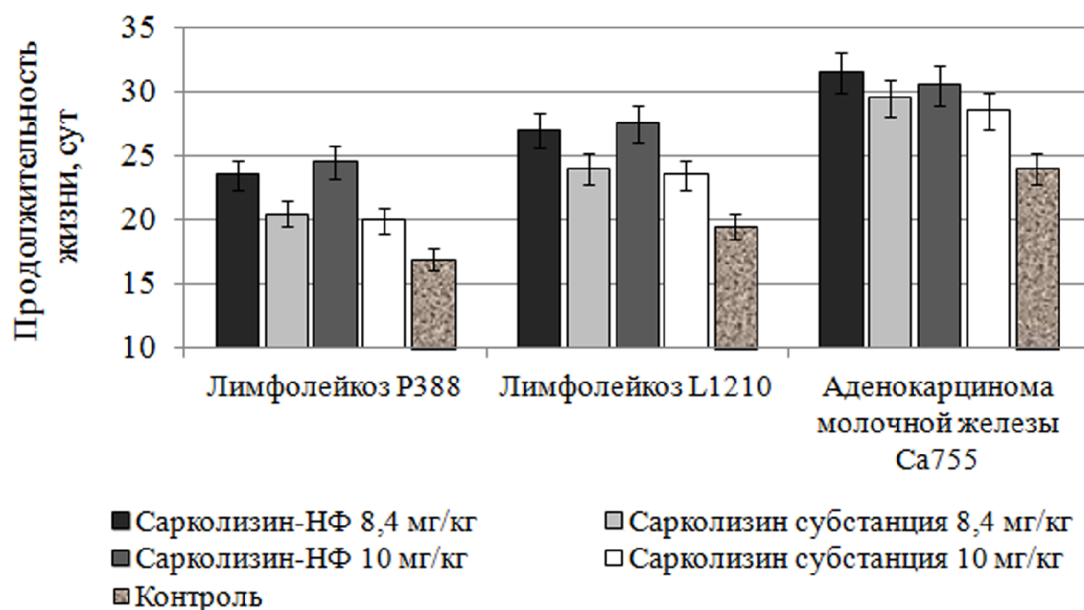


Рисунок 5. Продолжительность жизни мышей с опухолями в группах, получавших Сарколизин или Сарколизин-НФ (в дозах по сарколизину 8,4 мкг/кг или 10 мкг/кг) (препараты вводили в хвостовую вену мышей 4-хкратно, 1 раз в сутки через день).

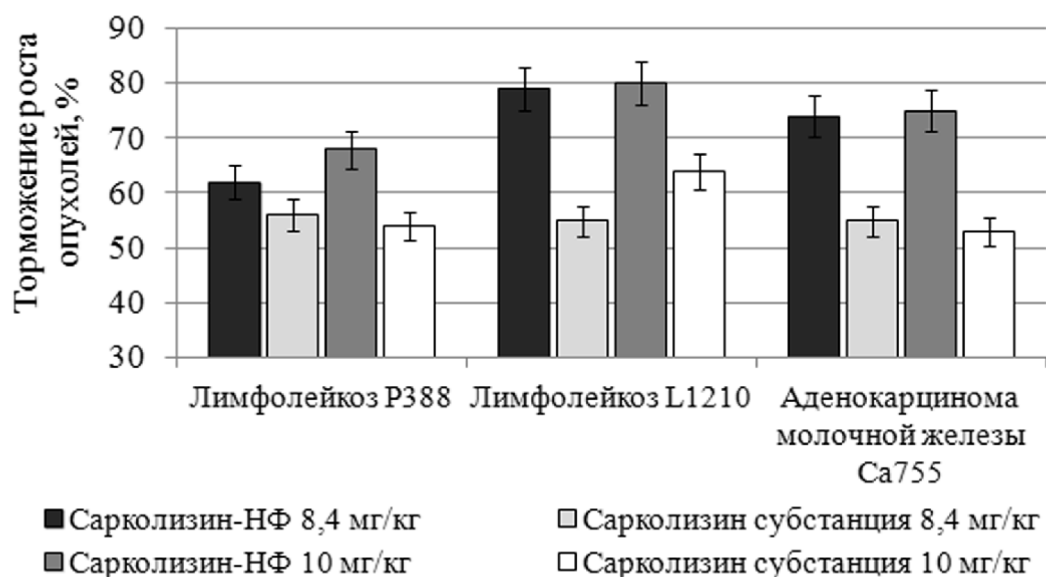


Рисунок 6. Торможение роста опухолей у мышей, получавших различные формы препаратов сарколизина (в % по отношению к контролю, без лечения).

Таблица 2. Значения LD₅₀ при внутривенном введении Сарколизина-НФ в сравнении с данными для его лекарственных форм (Мелфалана)

Вид животного	LD ₅₀ , мг/кг		
	Сарколизин-НФ	Сарколизин свободный (мелфалан)	
		Мелфалан ("Sigma-Aldrich", США) [19]	Алкеран ("Glaxo", Италия) [20]
Мыши	22,3	20,8	—
Крысы	12,9	4,1	5,3

Изучение острой токсичности препарата Сарколизин-НФ

При изучении острой токсичности на мышах полученные средние значения LD₅₀ Сарколизина-НФ (22,2 мг/кг) были сходными с таковыми для свободного сарколизина (препарат Мелфалан, "Sigma-Aldrich" (США)), приведёнными в работе Кук с соавт. — 20,8 мг/кг [19] (табл. 2).

Для крыс значение LD₅₀ Сарколизина-НФ оказалось значительно ниже, чем для мышей, как и в работе [19] для Мелфалана, очевидно, вследствие их большей чувствительности к вводимым агентам. При этом полученная нами величина LD₅₀ для Сарколизина-НФ была в 3 раза выше приведённой в работе [19] величины для Мелфалана — 12,9 мг/кг по сравнению с 4,1 мг/кг, что говорит о меньшей токсичности разработанной наноконструкции ЛПС. Токсичность её оказалась более низкой и по сравнению с другой лекарственной формой свободного сарколизина (мелфалана) — препарата Алкеран ("Glaxo", Италия). Величина LD₅₀ для него на крысах была определена в работе Tretiakova с соавт. [20] параллельно с исследованием токсичности сходного препарата — другого липофильного пролекарства сарколизина в липосомах с диаметром 118-119 нм. Авторы получили для этой композиции величину LD₅₀ 8,1±2,5 мг/кг, а для Алкерана — 5,3±1,0 мг/кг, то есть Сарколизин-НФ оказался по сравнению с этим препаратом вдвое менее токсичным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Включение терапевтических агентов в наночастицы и конструирование пролекарств, превращающихся в организме в исходное действующее лекарство, являются эффективными подходами современной биофармацевтики. Они дают возможность оптимизации имеющихся лекарственных препаратов и преодоления некоторых свойственных им недостатков. Оба указанных подхода были применены в настоящей работе, которая явилась продолжением предыдущего исследования по созданию и характеристике такой системы на основе противоопухолевого агента сарколизина (мелфалана). При этом лекарство использовали в виде предварительно синтезированного липидного производного, включённого в фосфолипидные наночастицы диаметром менее 30 нм (Сарколизин-НФ) [14]. При введении разработанной системы мышам наблюдалось увеличение на 25% по сравнению со свободным сарколизином площади под кривой "концентрация – время" (AUC), достигаемое, в основном, за счёт некоторого прироста его первоначального уровня в крови. Однако для мышей с опухолью это относительно небольшое увеличение оказалось сопряжённым с большим накоплением высвободившегося сарколизина в опухолевой ткани — в 2-2,5 раза через 2-4 ч после введения. При этом, в отличие от введения свободного сарколизина, наблюдалось также

и пролонгированное его присутствие (более 24 ч), а значит, и возможность действия в опухоли и в крови животных. При введении мышам с тремя моделями опухолей показан более выраженный противоопухолевый эффект этой системы, чем для свободного сарколизина. Введение Сарколизина-НФ оказывало достоверно больший (по сравнению со свободным сарколизином) эффект на опухоли разной этиологии (лимфолейкоз P388, лимфолейкоз L1210, аденокарцинома молочной железы Ca755 у мышей), приводя к более активному торможению их роста и увеличению продолжительности жизни животных. При введении Сарколизина-НФ в дозе 8,4 мг/кг торможение роста опухоли, особенно для лимфолейкоза L1210 и аденокарциномы молочной железы Ca755, превысило данный показатель при введении субстанции на 24% и 17% соответственно. В дозе 10 мг/кг увеличение продолжительности жизни животных наблюдалось более выражено для лимфолейкоза P388, лимфолейкоза L1210 и аденокарциномы молочной железы и составило 25%, 17,4%, и 11% соответственно. Величина LD₅₀, отражающая острую токсичность Сарколизина-НФ, в опытах на крысах была в 2-3 раза выше (то есть токсичность ниже) по сравнению с данными для двух коммерческих форм свободного сарколизина (мелфалана).

Таким образом, результаты исследования сконструированной наносистемы свидетельствуют о её перспективности и целесообразности проведения дальнейших её разработок и развития. В частности, увеличение эффективности её противоопухолевого действия можно достичь путём возможных модификаций транспортирующих ЛПС фосфолипидных наночастиц и придания им специфической опухолевой направленности, отсутствие которой считают основной причиной побочных действий и самого сарколизина [1, 3, 4]. Такой подход с присоединением к поверхности частиц специфических таргетных фрагментов (чаще всего пептидов), аффинных к некоторым повышенно экспрессирующимся белкам опухолевых клеток, активно разрабатывается и используется в последние годы [21]. Применялся он также ранее и нами для той же нанофосфолипидной системы с включением ряда других противоопухолевых лекарств, показав повышение эффективности [22]. В дальнейшем планируются исследования, направленные на выбор векторных таргетных молекул с наибольшей афинностью к опухолевым клеткам при гемобластозах, разработка способа их присоединения к поверхности фосфолипидных наночастиц и проведения исследований эффективности модифицированной таким образом системы Сарколизин-НФ. Целесообразно также проведение экспериментов для исследования механизма действия препарата Сарколизин-НФ и его планируемых модификаций в контексте превращения содержащегося в них ЛПС в исходное действующее лекарство.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все проводимые эксперименты на животных соответствовали Национальному стандарту России 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramírez-Arroniz J.C., Martínez Klimova E., Pedro-Hernández L.D., Organista-Mateos U., Cortez-Maya S., Ramírez-Ápan T., Martínez-García M. (2018) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **44**(8), 1342-1349.
2. van Kan M., Burns K.E., Helsby N.A. (2021) *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **88**, 755-769.
3. Sidiqi M.H., Aljama M.A., Muchtar E., Buadi F.K., Warsame R., Lacy M.Q., Dispenzieri A., Dingli D., Leung N., Gonsalves W.I., Kapoor P., Kourelis T.V., Hogan W.J., Wolf R.C., Kumar S.K., Gertz M.A. (2019) *Bone Marrow Transplant.*, **54**(7), 1077-1081.
4. Краснов В.П., Королева М.А., Водовозова Е.Л. (2013) *Успехи химии*, **82**(8), 783-814. [Krasnov V.P., Korolyova M.A., Vodovozova E.L. (2013) *Russ. Chem. Rev.*, **82**(8), 783-814.]
5. Menna P., Salvatorelli E., Minotti G. (2008) *Chem. Res. Toxicol.*, **21**(5), 978-989.
6. Ajazuddin, Alexander A., Amarji B., Kanaujia P. (2013) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **39**(7), 1053-1062.
7. Alexander A., Saraf S., Saraf S. (2015) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **41**(12), 1954-1961.
8. Garfall A.L., Vogl D.T., Weiss B.M., Stadtmauer E.A. (2013) *Bone Marrow Transplant.*, **48**(11), 1377-1386.
9. Lu B., Huang D., Zheng H., Huang Z., Xu P., Xu H., Yin Y., Liu X., Li D., Zhang X. (2013) *Carbohydr. Polym.*, **98**(1), 36-42.
10. Delforouh M., Strese S., Wickström M., Larsson R., Enblad G., Gullbo J. (2016) *BMC Cancer*, **16**(1), 1-9.
11. Gajek A., Pocza A., Łukawska M., Cecuda-Adamczewska V., Tobiasz J., Marczak A. (2020) *Sci. Rep.*, **10**(1), 1-14.
12. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovsky J., Vodovozova E. (2009) *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **19**(1), 51-59.
13. Pocza A., Rogalska A., Marczak A. (2021) *J. Clin. Med.*, **10**(9), 1841. DOI: 10.3390/jcm10091841.
14. Терешкина Ю.А., Санжак М.А., Кострюкова Л.В., Короткевич Е.И., Чистов А.А., Тихонова Е.Г., Прозоровский В.Н., Инамова О.М. (2019) *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(3), e00098. [Tereshkina Yu.A., Sanzhakov M.A., Kostriukova L.V., Korotkevich E.I., Chistov A.A., Tikhonova E.G., Prozorovsky V.N., Ipatova O.M. (2019) *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **2**(3), e00098.] DOI: 10.18097/bmcrm00098.

15. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В., Утешев Д.Б., Яворский А.Н. (2012) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Часть первая. М.: Гриф и К, сс. 642-656. [Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Vasiliev A.N., Verstakova O.L., Zhuravleva M.V., Lepakhin V.K., Korobov N.V., Merkulov V.A., Orekhov S.N., Sakaeva I.V., Uteshev D.B., Yavorsky A.N. (2012) Guidelines for conducting preclinical studies of drugs, part 1. M.: Grif & K, pp. 642-656.]
16. Мирошниченко И.И. (2011) Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. М.: Медицинское информационное агентство, 416 с. [Miroshnichenko I.I. (2011) Rational dosage and monitoring of medicines. M.: Medical Information Agency, 416 p.]
17. O'Neal D.P., Hirsch L.R., Halas N.J., Payne J.D., West J.L. (2004) *Cancer Lett.*, **209**(2), 171-176.
18. Kostryukova L.V., Prozorovskiy V.N., Medvedeva N.V., Ipatova O.M. (2018) *FEBS Open Bio*, **8**(2), 201-210.
19. Kue C.S., Tan K.Y., Lam M.L., Lee H.B. (2015) *Experimental Animals*, **64**(2), 129-138.
20. Tretiakova D., Svirshchevskaya E., Onishchenko N., Alekseeva A., Boldyrev I., Kamyshevsky R., Natykan A., Lokhmotov A., Arantseva D., Shobolov D., Vodovozova E. (2020) *Curr. Drug Deliv.*, **17**(4), 312-323.
21. Liu Y., Bravo K.M.C., Liu J. (2021) *Nanoscale Horizons*, **6**(2), 78-94.
22. Torkhovskaya T.I., Kostryukova L.V., Tereshkina Y.A., Tikhonova E.G., Morozovich G.E., Plutinskaya A.D., Lupatov A.Yu., Pankratov A.A. (2021) *Biomed. Pharmacother.*, **131**, 111154. DOI:10.1016/j.biopha.2020.111154.

Поступила в редакцию: 17. 11. 2021.
 После доработки: 29. 11. 2021.
 Принята к печати: 30. 11. 2021.

THE EFFECT OF LIPID DERIVATIVE OF ANTI-TUMOR DRUG SARCOLYSIN EMBEDDED IN PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES IN THE EXPERIMENTS *IN VIVO*

Yu.A. Tereshkina, T.I. Torkhovskaya, M.A. Sanzhakov, L.V. Kostryukova, Yu.Yu. Khudoklinova, E.G. Tikhonova*

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

To improve the therapeutic properties of the antitumor agent Sarcolysin, we have previously developed and characterized a dosage form representing its ester conjugate with decanol embedded in ultra-small phospholipid nanoparticles less than 30 nm in size (Sarcolysin-NP). The effect of the resulting composition was investigated *in vivo* in comparison with the free substance of sarcolysin. The composition intravenous administration to mice showed an improvement in the pharmacokinetic parameters of sarcolysin associated with its initial higher (by 22%) level in the blood and prolonged circulation, which was also observed in mice with P388 tumor. In mice with three types of tumors — lymphocytic leukemia P388, lymphocytic leukemia L1210, and adenocarcinoma of the mammary gland Ca755 — administration of two doses of sarcolysin over a period of 7 days showed its predominant antitumor effect. The maximum tumor growth inhibition was noted for lymphocytic leukemia L1210 and adenocarcinoma of the mouse mammary gland Ca755 (at a dose of Sarcolysin-NP — 8.4 mg/kg), which was higher in comparison with free substance by more than 24% and 17%, respectively. Differences in the life span of the treated animals were revealed significantly at a dose of 10 mg/kg and amounted to 25% and 17.4% for lymphocytic leukemia P388 and L1210, respectively, and 11% for adenocarcinoma Ca755. In an experiment on rats, acute toxicity of Sarcolysin-NP administered intravenously showed that an average LD₅₀ value 2-3 times exceeded a similar parameter for commercial preparations of free sarcolysin (Melphalan and Alkeran), which indicates its lower toxicity.

Key words: sarcolysin; lipid derivative; phospholipid nanoparticles; oncology; myeloma

Funding. The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030.

Received: 17.11.2021, revised: 29.11.2021, accepted: 30.11.2021.