

УДК 577.114.7;577.352.2;615.322;616-006

©Коллектив авторов

## ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ПРОЛЕКАРСТВ КОМБРЕТАСТАТИНА А4 И ЕГО 4-АРИЛКУМАРИНОВОГО АНАЛОГА: ПРОТИВООПУХОЛЕВОЕ ДЕЙСТВИЕ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

**Е.В. Моисеева<sup>1</sup>, Н.Р. Кузнецова<sup>1</sup>, Е.В. Свирщевская<sup>1</sup>, Н.В. Бовин<sup>1</sup>, Н.С. Ситников<sup>2</sup>, А.С. Шавырин<sup>3</sup>, И.П. Белецкая<sup>4</sup>, С. Комб<sup>5</sup>, А.Ю. Федоров<sup>2</sup>, Е.Л. Водовозова<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10; тел.: (495) 330-6610; факс (495) 330-6601; эл. почта: elvod@ibch.ru

<sup>2</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород

<sup>3</sup>Институт металлоорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, Нижний Новгород

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

<sup>5</sup>UMR-CNRS 6264, Университет Экс-Марсель 1 и 2, Факультет Сент-Жером, Марсель, Франция

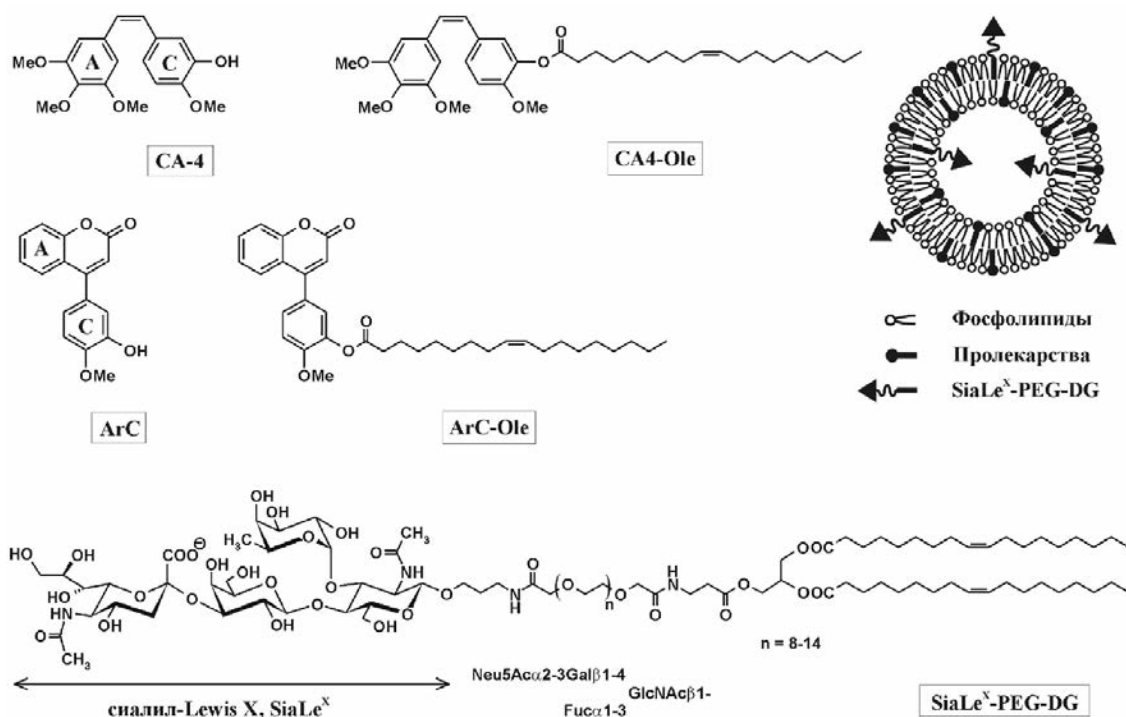
Антимитотический агент комбретастин А4 (CA-4) сравнительно недавно предложен в качестве антивазкулярного средства для противоопухолевой терапии. С целью уменьшения системной токсичности за счет применения в виде липосомальных препаратов, в данной работе синтезированы новые липофильные пролекарства – олеоильные производные CA-4 и его 4-арилкумаринового аналога (ArC): CA4-Ole и ArC-Ole, соответственно. Показано, что липосомы среднего диаметра 100 нм, полученные на основе яичного фосфатидилхолина и фосфатидилинозита из пекарских дрожжей, количественно включают до 15 моль-% CA4-Ole или 7 моль-% ArC-Ole. Также получены липосомы с пролекарствами, оснащённые тетрасахаридным лигандом селективов, а именно сиалил-Lewis X (SiaLe<sup>x</sup>), с целью адресной доставки к эндотелию формирующейся *de novo* сосудистой системы. Противоопухолевые свойства *in vivo* изучали на модели медленно растущего рака молочных желез (РМЖ) мышей. В используемых дозировке (22 мг/кг) и протоколе введения (4 раза с интервалом в одну неделю, начиная с появления пальпируемых опухолей) цитостатик CA-4 не оказал противоопухолевого действия, более того, даже стимулировал рост РМЖ. Липосомальные формы CA4-Ole не оказывали стимулирующего действия на рост опухолей. Однако, для получения выраженного противоопухолевого эффекта, очевидно, необходимо увеличить кратность введения препаратов липосом. Новый антимитотический агент ArC показал меньший на порядок уровень цитотоксичности *in vitro* в культуре клеток карциномы молочной железы человека. Тем не менее, при испытаниях на мышинной модели РМЖ полученный аналог показал противоопухолевый эффект в двухкратной эквивалентной дозе по CA-4. Результаты показывают перспективность применения ArC-Ole в липосомах, оснащённых SiaLe<sup>x</sup>: препарат частично подавлял рост опухоли уже после второго введения. Необходим дальнейший подбор доз и режимов введения ArC и препаратов липосом с ArC-Ole.

**Ключевые слова:** комбретастин А4, 4-арилкумарины, липофильные пролекарства, липосомы, сиалил-Lewis X, рак молочной железы.

\* - адресат для переписки

## ЛИПОСОМЫ С ПРОЛЕКАРСТВАМИ КОМБРЕСТАТИНА А4 И 4-АРИЛКУМАРИНА

**ВВЕДЕНИЕ.** Комбретастин А4 (СА-4, рис. 1) – один из наиболее эффективных антимитотических агентов растительного происхождения, блокатор колхицинового сайта тубулина – сравнительно недавно был предложен в качестве антивазкулярного средства для противоопухолевой терапии [1]. В настоящее время СА-4 в виде водорастворимого фосфата (СА4Р) проходит III фазу клинических испытаний. Химиотерапия антивазкулярными средствами приводит к значительному замедлению кровотока в опухолевой ткани и, как следствие, к гипоксии и нарушению метаболизма в опухоли. Однако показано, что при этом неспецифически разрушаются и сосуды нормальных тканей, в том числе сердца, мозга, селезенки, кожи и почек пациентов. В случае мозга и сердца, даже относительно кратковременные изменения в кровоснабжении могут стать причиной серьезных осложнений. Кроме того, в экспериментах на животных эти лекарства нередко эффективны только в дозах, превышающих толерантные [2].



**Рисунок 1.**

Структуры липофильных пролекарств комбретастина А4 и 4-арилкумарина, липофильного конъюгата SiaLe<sup>x</sup> и схематическое изображение адресной лекарственной липосомы.

Включение лекарств в состав био- и гемосовместимых наноразмерных носителей позволяет улучшить биораспределение и уменьшить системную токсичность благодаря уменьшению концентрации свободных препаратов в кровотоке и накоплению частиц в опухолях и очагах воспаления за счёт повышенной проницаемости эндотелия формирующейся *de novo* сосудистой системы (эффект EPR, enhanced permeability and retention) [3, 4]. Такой пассивный транспорт наилучшим образом обеспечивается системами доставки лекарств среднего диаметра 50-150 нм. Липосомы в качестве носителей уже применяются в химиотерапии для системного введения препаратов; привитые на поверхность липосом остатки полиэтиленгликоля (ПЭГ) защищают их от преждевременного вывода из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы (липосомы Stealth®) [5]. Так, в клинической практике показано, что включение

противоопухолевого антибиотика доксорубицина в липосомы диаметра примерно 100 нм позволяет существенно уменьшить нежелательные побочные эффекты исходного лекарства [6].

Однако технологически приемлемый способ включения водорастворимых препаратов во внутренний объём липосом – метод активной загрузки (remote loading) против градиентов концентраций ацетата кальция или сульфата аммония – реализуем только для ограниченного числа лекарств, имеющих структуру амфифильных слабых кислот или оснований, например, антибиотиков антрациклинового ряда [7]. В связи с этим интерес представляют липофильные пролекарства, которые могут быть встроены в липидный бислой липосом. Такой подход не только упрощает технологию получения липосомальных препаратов, но и способен улучшить их фармакокинетику за счет уменьшения потерь при повреждении мембраны липосомы, как в кровотоке, так и при взаимодействии с клеткой-мишенью. Ранее нами были синтезированы липофильные пролекарства мелфалана (сарколизина) и метотрексата – широко применяемых в клинике противоопухолевых средств; в виде сложноэфирных конъюгатов с дилицеридами лекарства эффективно (до 10 моль-% по отношению к матричным липидам) включались в липидный бислой липосом среднего диаметра ~100 нм [8]. Сложноэфирная связь легко подвергается гидролизу внутриклеточными эстеразами, поскольку они менее специфичны, чем амидазы и широко представлены во всех тканях. В то же время, в составе липосом пролекарства оказались устойчивы к преждевременному гидролизу эстеразами плазмы крови человека [9]. Противоопухолевое действие липосомальных препаратов мелфалана продемонстрировано на моделях лимфолейкоза [10] и рака молочных желез мышей [11].

Нами показано, что при включении в липосомы, нагруженные липофильными пролекарствами, тетрасахаридного лиганда селектинов, а именно сиалил-Lewis X (SiaLe<sup>x</sup>, рис. 1), в виде конъюгата с олигоэтиленгликольоктадецилом противоопухолевый эффект значительно усиливается [11]. Селектины (углеводсвязывающие адгезионные белки) повышено экспрессированы на активированных эндотелиальных клетках, лейкоцитах и тромбоцитах. Они участвуют в первоначальных взаимодействиях между циркулирующими лейкоцитами и эндотелиальными клетками и вовлечены во множество (пато)физиологических процессов, в том числе, развитие воспалительного ответа, метастазирования и пр. [12]. Недавно SiaLe<sup>x</sup>-липосомы были использованы в качестве средства доставки доксорубицина после сосудистой хирургии у крыс с целью предотвращения стеноза [13].

Pattillo с соавторами [14] предложили включать СА4Р в липосомы, несущие на дистальном остатке ПЭГ полноразмерное моноклональное антитело к Е-селектину. Эти авторы использовали явление повышения экспрессии молекул адгезии на опухолевом эндотелии в результате облучения и показали значительное ингибирование роста рака молочных желез у мышей при системном введении иммунолипосом после облучения [14]. Ранее в этой же группе были получены ПЭГ-липосомы, содержащие водонерастворимую исходную форму СА-4 в липидном бислое и нацеленные с помощью циклического RGD-пептида на  $\alpha v \beta 3$ -интегрины [15]. Однако ёмкость загрузки таких липосом СА-4 составила менее 3 моль-%, поэтому они не представили интереса для системного введения животным.

Небольшую гидрофобную молекулу СА-4 действительно целесообразно включать в аполярную часть липидного бислоя, но для надежного удерживания в липосомах за счёт гидрофобных взаимодействий она должна быть модифицирована дополнительным алкильным мембранным якорем. Целью настоящей работы явилось создание липосомальных форм, в том числе оснащенных SiaLe<sup>x</sup>-лигандом, ацильных пролекарств комбретастина А4 и его структурного аналога 4-арилкумарина ArC (рис. 1) и изучение

их противоопухолевого действия на модели рака молочной железы (РМЖ). Наличие в молекуле ArC и других подобных производных 4-арилкумарина двух некомпланарных син-арильных фрагментов А и С, соединённых ригидной С-С связью, делает их структурно похожими на СА-4 [16, 17]. Действительно, 4-арилкумариновые аналоги СА-4 так же блокируют G2/M фазу клеточного цикла, обладают сравнимым с СА-4 уровнем цитотоксической и антимиотической активности в культурах ряда линий опухолевых клеток человека, а также близкими значениями констант связывания с тубулином, что позволяет отнести оба типа молекул к лигандам колхицинового сайта этого белка [16, 18]. Важным достоинством ArC и других 4-[2-(гидроксиметил)арил]кумаринов, по сравнению с СА-4, является их жесткая структура [16-18], в то время как склонность СА-4 к легким Z/E изомеризациям приводит к значительному снижению его противоопухолевой активности в ходе хранения и применения [19].

#### МЕТОДИКА.

*Синтезы пролекарств.* Комбретастин А-4 получен по стандартной методике [20]. 4-Арилкумарин ArC синтезировали аналогично другим 4-[2-(гидроксиметил)арил]кумарином [16]. Спектры  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker ARX 400 (США) в  $\text{CDCl}_3$  при 300,13 МГц и 75,54 МГц соответственно; химические сдвиги приведены в шкале  $\delta$  (м.д.) с использованием остаточных сигналов растворителя ( $^1\text{H}$ -ЯМР  $\delta$  7,24,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР  $\delta$  77,0). С-, Н-анализ выполнен на приборе Perkin-Elmer Series II CHN/O Analysis 2400 (США). Для колоночной хроматографии использовали силикагель-60 (70-230 меш, "Alfa Aesar", Германия). Использовали реагенты фирм "Sigma-Aldrich" (США) или "Lancaster" (Великобритания). Растворители очищали стандартными методами. Продукты реакции после очистки высушивали при 20 Па.

**5-(3,4,5-Триметоксистирил)-2-метоксифенолеат (СА4-Ole).** К раствору олеиновой кислоты (0,21 г, 0,76 ммоль) в безводном тетрагидрофуране (THF, 2 мл) в инертной атмосфере прибавляли оксалилхлорид (80 мкл, 0,87 ммоль), перемешивали 1 ч при 65°C. Смесь упаривали, высушивали. Остаток растворяли в 2 мл THF в инертной атмосфере и прибавляли по каплям к натриевому феноляту СА-4, который был получен путем прибавления NaH (0,015 г, 0,64 ммоль) в виде 60% суспензии в минеральном масле к раствору СА-4 (0,18 г, 0,58 ммоль) в безводном THF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали 2 ч при 65°C, затем упаривали. Остаток растворяли в этилацетате и трижды экстрагировали 5%-ным раствором NaOH. Органический слой сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выделяли продукт хроматографией на колонке с силикагелем (элюент этилацетат-петролейный эфир 40/65, 1:4). Выход СА4-Ole 0,23 г (67%); бесцветное масло. Найдено (%): С, 74,29; Н, 9,04.  $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{O}_6$ . Вычислено (%): С, 74,45; Н, 9,02. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.; J, Гц): 0,88 (м, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,31 (м, 20H,  $\text{CH}_2$ ); 1,72 (м, 2H,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 2,03 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ ); 2,52 (т, 2H,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$ , J 8,0); 3,70 (с, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,79 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3,83 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,35 (м, 2H,  $\text{CH}=\text{CH}$ ); 6,45 (с, 2H,  $\text{ArCH}=\text{CHAr}$ ); 6,50 (с, 2H, H2', H6'); 6,84 (д, 1H, H5'', J 8,0); 6,99 (д, 1H, H2'', J 2,0); 7,11 (д.д., 1H, H6'', J 2,0, J 8,0). Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.): 14,1; 22,7; 25,0; 27,2; 29,0; 29,2; 29,3; 29,5; 29,7; 31,9; 33,9; 55,8; 55,9; 60,9; 105,9; 112,0; 123,2; 127,6; 128,6; 129,5; 129,7; 130,0; 132,4; 137,2; 139,5; 150,3; 153,0; 171,7.

**4-(4-Метоксн-3-олеилоксифенил)-хромен-2-он (ArC-Ole)** получен аналогично СА4-Ole. Из 0,03 г ArC получено 0,04 г (76%) ArC-Ole в виде жёлтого масла. Найдено (%): С, 76,42; Н, 8,28.  $\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_5$ . Вычислено (%): С, 76,66; Н, 8,33. Спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.; J, Гц): 0,85 (м, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 1,30 (м, 20H,  $\text{CH}_2$ ); 1,78 (м, 2H,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2$ ); 2,02 (м, 4H,  $\text{CH}_2\text{CH}$ ); 2,61 (т, 2H,  $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2$ , J 7,4); 3,91 (с, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,34 (м, 2H, CH); 6,36 (с, 1H, H3); 7,12 (м, 2H, H5', H6'); 7,34 (м, 3H, H2', H6, H8); 7,55 (м, 2H, H5, H7). Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\delta$ , м.д.): 14,1; 22,6; 25,0; 27,1; 27,1; 29,0; 29,1; 29,2; 29,3; 29,5; 29,7; 29,8; 31,6; 31,9; 34,0; 56,0; 112,6; 115,0; 117,3; 118,8; 123,3; 124,2; 126,9; 127,0; 127,6; 129,7; 130,0; 131,9; 140,0; 152,5; 154,2; 154,3; 160,7; 171,6.



*Приготовление дисперсий лекарственных липосом.* Использовали фосфатидилхолин (PC) из яичного желтка и фосфатидилинозит (PI) из *S. cerevisiae* производства “Реахим” (Россия). Гликоконъюгат SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG получали 3-х стадийным синтезом с использованием метода активированных эфиров, исходя из бискарбоксиметилового эфира ПЭГ средней массы 600 Да (“Aldrich”, США), 3-аминопропилгликозида SiaLe<sup>x</sup> и *rac*-1,2-диолеоил-3-(3-аминопропионил)глицерина. Готовили буферы с 1 мМ EDTA: PBS, pH 7,06 – физиологический раствор на фосфатном буфере (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); HBS, pH 7,2 – физиологический раствор на буфере HEPES (25 мМ HEPES-Na, 140 мМ NaCl); HEPES – *N*-(2-гидроксиэтил)пиперазин-*N'*-2-этансульфоная кислота (“Flow Laboratories”).

Смеси PC/PI/CA4-Ole(+/-SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG), 7,5:1:1,5:(+/-0,2) (мол.), или PC/PI/ArC-Ole(+/-SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG), 8:1:0,7:(+/-0, 2) (мол.), упаривали в круглодонных пробирках из растворов в хлороформе на ротаторном испарителе при температуре не выше 40°C. Смеси содержали по 54 мг PC, 8 мг PI, 8 мг (14 мкмоль) CA4-Ole и 4 мг SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG (~1,87 мкмоль), или 81 мг PC, 11,4 мг PI, 5 мг (9,2 мкмоль) ArC-Ole и 5,6 мг SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG (~2,6 мкмоль). Липидные пленки высушивали 30 мин при 5 Па, затем гидратировали в течение 2 ч при комнатной температуре в 2 мл буфера PBS при получении липосом для экспериментов в культуре клеток или с животными или HBS – для определения включения CA4-Ole и ArC-Ole в липосомы. Суспензию встряхивали, подвергали 5-кратной процедуре замораживания – оттаивания (жидкий азот – +40°C) и продавливали 20 раз через поликарбонатные мембранные фильтры (“Nucleopore”, США) с размером пор 100 нм с помощью установки Mini-extruder от Avanti Polar Lipids (США). По данным динамического лазерного светорассеяния, для разных препаратов средний диаметр липосом составил от 92±30 нм до 105±33 нм; измерения проведены на установке Brookhaven Particle Analyzer 90+ (США). Концентрации пролекарств в дисперсиях определяли после разрушения липосом 20-кратным разбавлением в этаноле: регистрировали УФ-спектры, и измеряли оптическую плотность в максимумах поглощения (CA4-Ole:  $\lambda_{\text{макс}}$ =287 нм,  $\epsilon$  ~13440; ArC-Ole:  $\lambda_{\text{макс}}$ =307 нм,  $\epsilon$  ~10200) на двухлучевом спектрофотометре СФ-256-УВИ (“Ломофотоника”, С.-Петербург). Потери пролекарств на фильтрах контролировали, определяя их количество в растворах, полученных вымачиванием фильтров в этаноле, с последующей регистрацией УФ-спектров; потери составляли не более 3-5%. Состав липосом определяли после гель-хроматографии на колонке с Сефарозой CL-4В, анализируя фракции на фосфолипидный фосфор колориметрическим методом и на пролекарства – спектрофотометрически, как описано ранее для других препаратов [8, 9]; CA4-Ole и ArC-Ole практически полностью включались в липосомы. Дисперсии липосом хранили при +4°C не более 2-х суток.

*Определение цитотоксической активности in vitro.* Клетки карциномы молочной железы человека линии HBL-100 культивировали при 37°C в атмосфере 4% CO<sub>2</sub> в среде RPMI-1640 (“ICN Biomedicals Inc.”, США) с добавлением 0,2% NaHCO<sub>3</sub>, 2 мМ *L*-глутамина, 50 мкг/мл гентамицина G, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% телячьей эмбриональной сыворотки (инактивированной нагреванием) (Gibco BRL, Великобритания), pH 7,4, и пересевали 2 раза в неделю. Клетки инкубировали 48 ч в культуральной среде в 24-луночных планшетах с различными образцами липосом, содержащими CA4-Ole или ArC-Ole в концентрациях 0,005-1 мкМ или 0,8-80 мкМ, соответственно, или с исходными CA-4 или ArC, добавленными в виде растворов в диметилсульфоксиде, конечная концентрация которого в среде с клетками не превышала 1% об., в концентрациях 0,001-0,2 мкМ или 0,01-1 мкМ, соответственно. Контрольные клетки инкубировали с аликвотой PBS с 1% диметилсульфоксида. Количество живых клеток определяли стандартным тестом с трипановым синим; процент живых клеток вычисляли

# ЛИПОСОМЫ С ПРОЛЕКАРСТВАМИ КОМБРЕСТАТИНА А4 И 4-АРИЛКУМАРИНА

как (количество живых клеток в эксперименте / количество живых клеток в контроле)×100. Эксперименты проведены в двух повторах каждый. Цитотоксическую активность (IC<sub>50</sub>) рассчитывали с помощью программы Origin 6.0 ("MicroCal Software Inc.", США).

*Испытания противоопухолевой активности in vivo.* Клетки РМЖ мышей C57BL/6J линии Wnt-1 получены из Национального института рака (NCI), Bethesda, и поддерживались *in vivo*. Мыши – самки линии C57BL/6 Lac Sto получены из питомника "Столбовая". Опухолевые клетки из культуры перевивали в дозе 10<sup>6</sup> клеток на мышь в жировую подушечку левой задней лапы. После появления пальпируемых опухолей самок разделили на группы так, чтобы в среднем по этим параметрам группы не различались. При испытаниях СА-4 и его производных было задействовано 35 мышей, 4-арилкумарина и его производных – 23 мыши.

Мышам вводили в хвостовую вену 4-хкратно с интервалом в одну неделю по 0,2 мл 7 мМ раствора СА-4 (22 мг/кг) в PBS-5% Твин-80 (n=6, группа 1), или дисперсий липосом состава PC/PI/CA4-Ole(+/-SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG), 7,5:1:1,5(+/-0,2) (мол.) в эквивалентной по СА-4 дозе (n=6–8 в группах 2 и 3). Контрольные группы (n=6–7 в каждой) получили буфер без детергента или PBS-5% Твин-80 (группы К1 и К2). В опытах с ArC вещество вводили в дозе 37 мг/кг (13,8 мМ в PBS-5% Твин-80), а препараты липосом содержали 1/3 экв. дозы ArC-Ole (4,6 мМ в 0,2 мл буфера; состав липосом 8:1:0,7:0,2). Приведенные данные представлены в таблице. Противоопухолевый эффект оценивали по динамике роста опухолей (измеряли средний диаметр опухоли, СДО) и улучшению выживания опухоленосителей.

*Таблица.* Средняя продолжительность жизни и процент выживания в группах мышей с перевитым раком молочных желез после лечения препаратами на основе комбрестатина А4 и 4-арилкумарина.

Группы	Доза (мкмоль/кг)	Доза (мг/кг)	n*	СПЖ	Выживание, %
Контроль PBS (К1)	—	—	7	75,6	14
Контроль PBS/Tween 80 (К2)	—	—	6	66,5	17
СА-4/Tween 80 (группа 1)	70	22	6	72,8	33
СА4-Ole в липосомах (группа 2)	70	40	7	82,3	25
СА4-Ole в SiaLe <sup>x</sup> -липосомах (группа 3)	70	40	8	81,1	25
Контроль PBS (К)	—	—	5	78,8	60
ArC/Tween 80 (группа 1)	138	37	6	86,5	83
ArC-Ole в липосомах (группа 2)	46	25	6	79,5	67
ArC-Ole в SiaLe <sup>x</sup> -липосомах (группа 3)	46	25	6	83,5	67

Примечание: \* - количество мышей в группе.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Липосомы получали из смесей природных фосфолипидов с пролекарствами и гликоконъюгатом стандартным методом экструзии через 100 нм-фильтры [8, 9, 21]. При этом образуются моноламеллярные (с единичным липидным бислоем) липосомы требуемого размера, несущие модифицированное лекарство и углеводный лиганд. Схематически конструкция липосомы изображена на рисунке 1. Контакт с рецептором на поверхности клетки-мишени обеспечивается за счёт экспонирования углеводных групп SiaLe<sup>x</sup> на достаточном расстоянии от мембраны с помощью полярных гибких вставок ПЭГ (степень полимеризации 8-14).

Известные липосомы Stealth<sup>®</sup> формируются из фосфолипидов, содержащих насыщенные ацильные остатки (обычно, гидрогенизированный соевый лецитин), и холестерина (до 30%) – чтобы уменьшить утечку препарата в кровотоке необходима жесткая мембрана [5, 6]. Липофильные пролекарства сами являются компонентом липидного бислоя и при его повреждении не покидают липосому, как показано нами для липидных конъюгатов водорастворимых лекарств [8, 9]. Жидкий липидный бислой способен включить больше пролекарства. Более того, он легче сливается с мембранами опухолевых клеток [22]. Поэтому в нашем случае основу бислоя липосом (до 90 мол. %) составляют фосфолипиды, содержащие примерно половину насыщенных ацильных остатков (пальмитоильных и стеароильных), а остальные – ненасыщенные олеоильные и меньшее количество линолеоильных остатков. Фосфатидилинозит (PI) выполняет функцию защиты от опсонизации в кровотоке: показано, что остатки инозита молекул PI, составляющих примерно 10% бислоя, создают на поверхности липосом высокогидратированную стерически стабилизирующую оболочку, подобно остаткам ПЭГ (степень полимеризации 45-48) в Stealth<sup>®</sup>-липосомах [23]. Фосфатидилинозит не должен вызывать побочных эффектов, в том числе аллергических реакций и мукозита, которые сопутствуют применению Stealth<sup>®</sup>-липосом [24].

Емкость включения CA4-Ole в липосомы среднего размера примерно 100 нм составила 15 мольн. %, причем пролекарство практически без потерь (то есть с эффективностью близкой к 100%) включалось в липидный бислой. В случае ArC-Ole такая же эффективность загрузки бислоя в условиях экструзии при 22–40°C получена для ёмкости липосом 7 моль-%.

Антипролиферативные свойства CA-4, его аналога и липосомальных препаратов пролекарств изучали на клетках РМЖ человека *in vitro*. После инкубации со всеми препаратами в течение 48 ч. наблюдались изменения клеточной морфологии: клетки адгезионного типа, для которых характерно распластывание на материале планшета, “ошаривались”, что может быть свидетельством блокировки стадии митоза. Данные о выживаемости клеток приведены на рисунке 2. Рассчитанные значения IC<sub>50</sub> (концентрация, вызывающая 50% ингибирование роста клеток) составили 0,0075±0,002, 0,096±0,003, 0,023±0,004 и 0,79±0,17 мкМ для CA-4, ArC и липосомальных CA4-Ole и ArC-Ole соответственно. При работе в культурах клеток обычное многократное (до нескольких десятков раз) понижение токсичности лекарств в составе наноразмерных носителей объясняется изменением механизма эндоцитоза, а также дополнительной стадией внутриклеточной разгрузки. Стадия гидролиза пролекарства также может замедлять проявление цитотоксической активности. Отметим также, что цитотоксичность аналога (ArC) оказалась примерно в 12 раз ниже цитотоксичности самого CA-4 (рис. 2).

Для оценки влияния препаратов на рост опухоли РМЖ *in vivo* их начинали вводить мышам-реципиентам внутривенно после возникновения пальпируемых опухолей. Мышей сортировали таким образом, чтобы группы были равнозначными на начало введения препаратов. Размеры опухолей в каждой группе находились в пределах от 0,6 до 8 мм. Для внутривенного введения животным исходные гидрофобные субстанции CA-4 и ArC солибилизировали в водной фазе с помощью фармакопейного детергента Твин-80, добавляя его до 5 об. %. В связи с этим одна из контрольных групп мышей (K2) получала инъекции PBS–5% Твин-80.

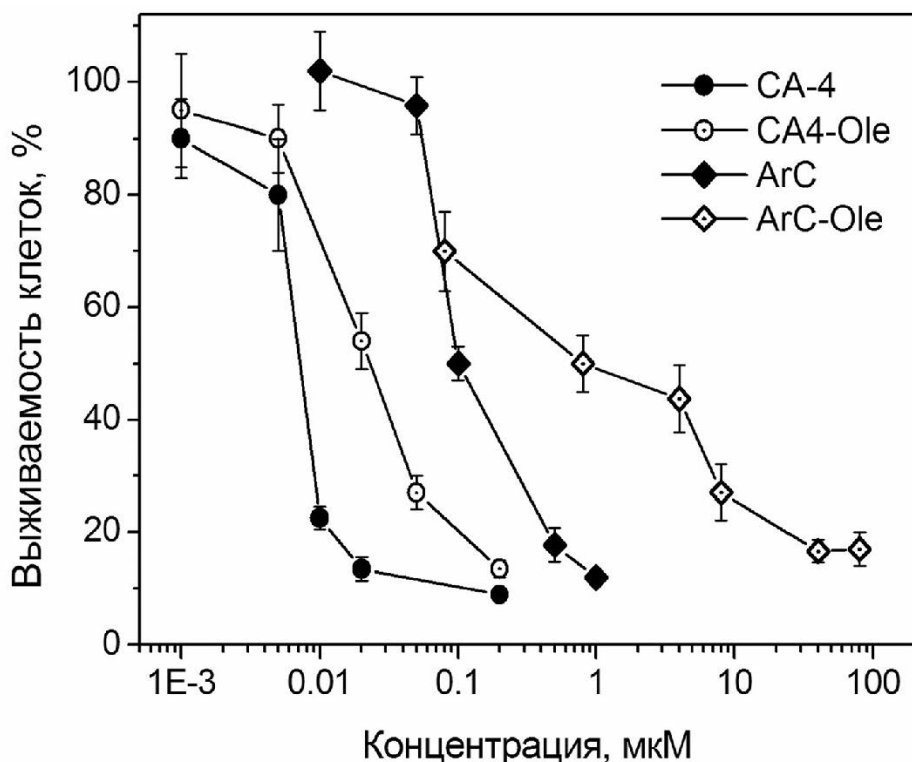


Рисунок 2.

Оценка цитотоксичности комбрестатина А4, 4-арилкумарина и липосомальных препаратов липофильных пролекарств в культуре клеток карциномы молочной железы человека HBL-100. Через 48 ч инкубации определяли количество живых клеток по включению трипанового синего. Процент живых клеток вычисляли как (количество живых клеток в эксперименте / количество живых клеток в контроле)×100.

Приведены средние значения ±SE для каждого эксперимента, проведенного в двух повторах.

Первый эксперимент проведен с СА-4 и его производными. На рисунке 3 приведены динамика роста опухоли (рис. 3а) и динамика выживания (рис. 3б) по группам. Достоверных различий по весу между группами не наблюдалось (данные не приведены). Была лишь заметна тенденция к уменьшению веса в группе K2 (PBS–Tween), что видимо явилось причиной смерти первых животных именно в этой группе (рис. 3б). Очевидно, детергент обладает токсичностью при системном введении в данной концентрации.

Анализ роста опухолей (рис. 3а) показал, что в обеих контрольных группах (K1 и K2) опухоли росли одинаково. Интактный препарат СА-4 (группа 1) незначительно стимулировал рост опухоли, начиная со второй инъекции. А липосомальные препараты СА4-Ole демонстрировали тенденцию к ослаблению этого эффекта, причем различий между обычными липосомами (группа 2) и SiaLe<sup>x</sup>-липосомами (группа 3) не наблюдалось.

Динамика выживания (рис. 3б) по сравнению с контрольной группой K1 была улучшена только у мышей, получивших липосомы с СА4-Ole (группа 2). Это привело к небольшому увеличению средней продолжительности жизни (СПЖ, таблица): 82,3 дня против 75,6 дней (+8,8%). СПЖ в группах не различались достоверно. Однако выявлена тенденция к увеличению СПЖ в группе, получавшей интактный СА-4, по сравнению с контролем K2 (+9,5%), и в группе, обработанной липосомами с СА4-Ole, по сравнению с СА-4 (+13%). Нацеленная форма препарата липосом (группа 3) не улучшила динамику выживания и показала увеличение СПЖ на уровне препарата без SiaLe<sup>x</sup> (СПЖ=81,1 день).



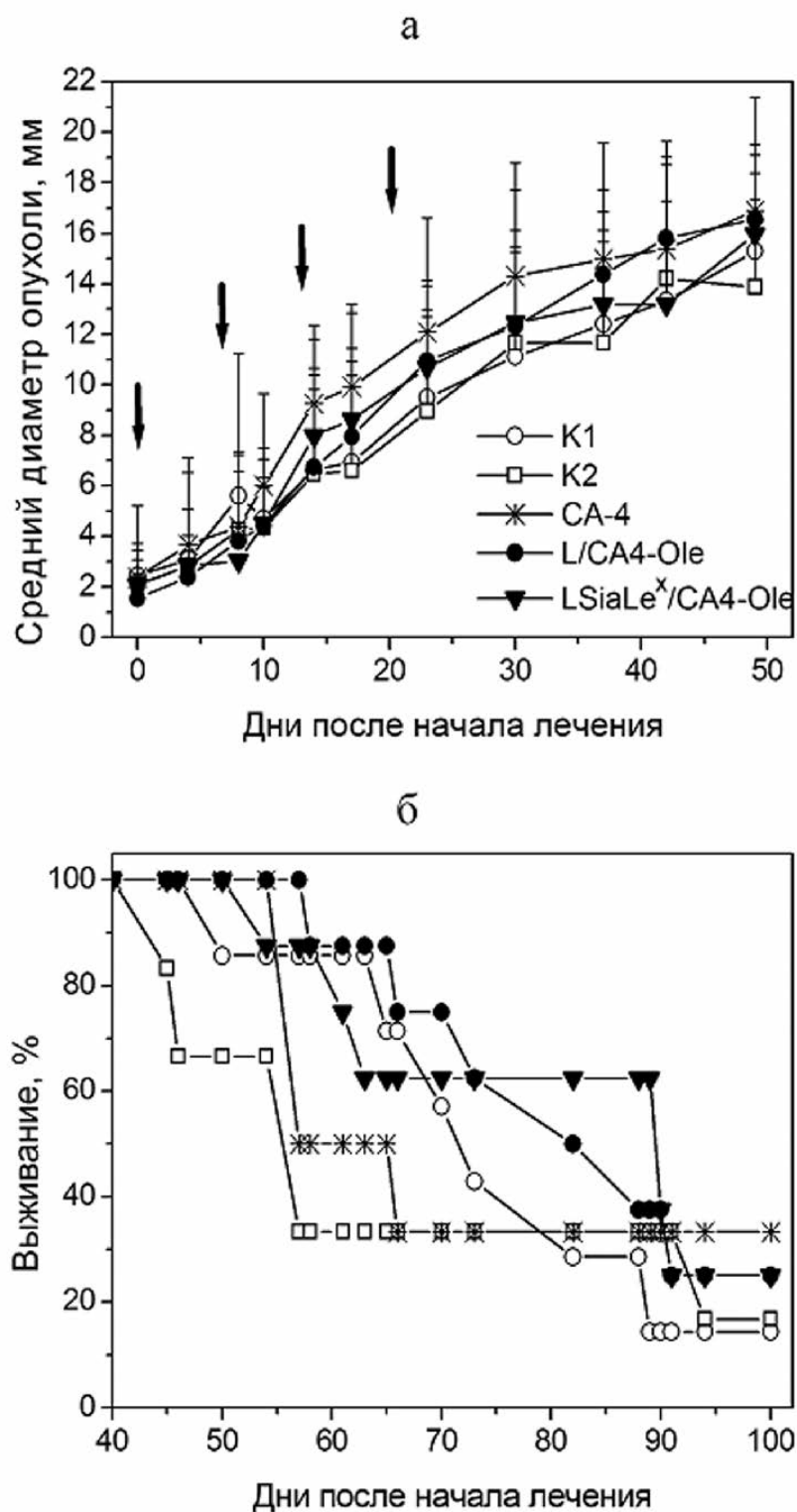


Рисунок 3.

Динамика роста опухоли (а) и динамика выживания (б) по группам мышей C57BL/6 с перевитым раком молочных желёз Wnt-1. После появления пальпируемых опухолей (диаметром от 0,6 до 8 мм в каждой группе) самкам вводили внутривенно 4 раза с интервалом в одну неделю по 0,2 мл PBS (K1, n=7), PBS-5% Твин-80 (K2, n=6), раствор CA-4 (22 мг/кг) в PBS-5% Твин-80 (CA-4, n=6), или CA4-Ole в эквивалентной дозе в липосомах (L/CA4-Ole, n=7) или SiaLe<sup>x</sup>-липосомах (LSiaLe<sup>x</sup>/CA4-Ole, n=8). Дни введения препаратов отмечены вертикальными стрелками.

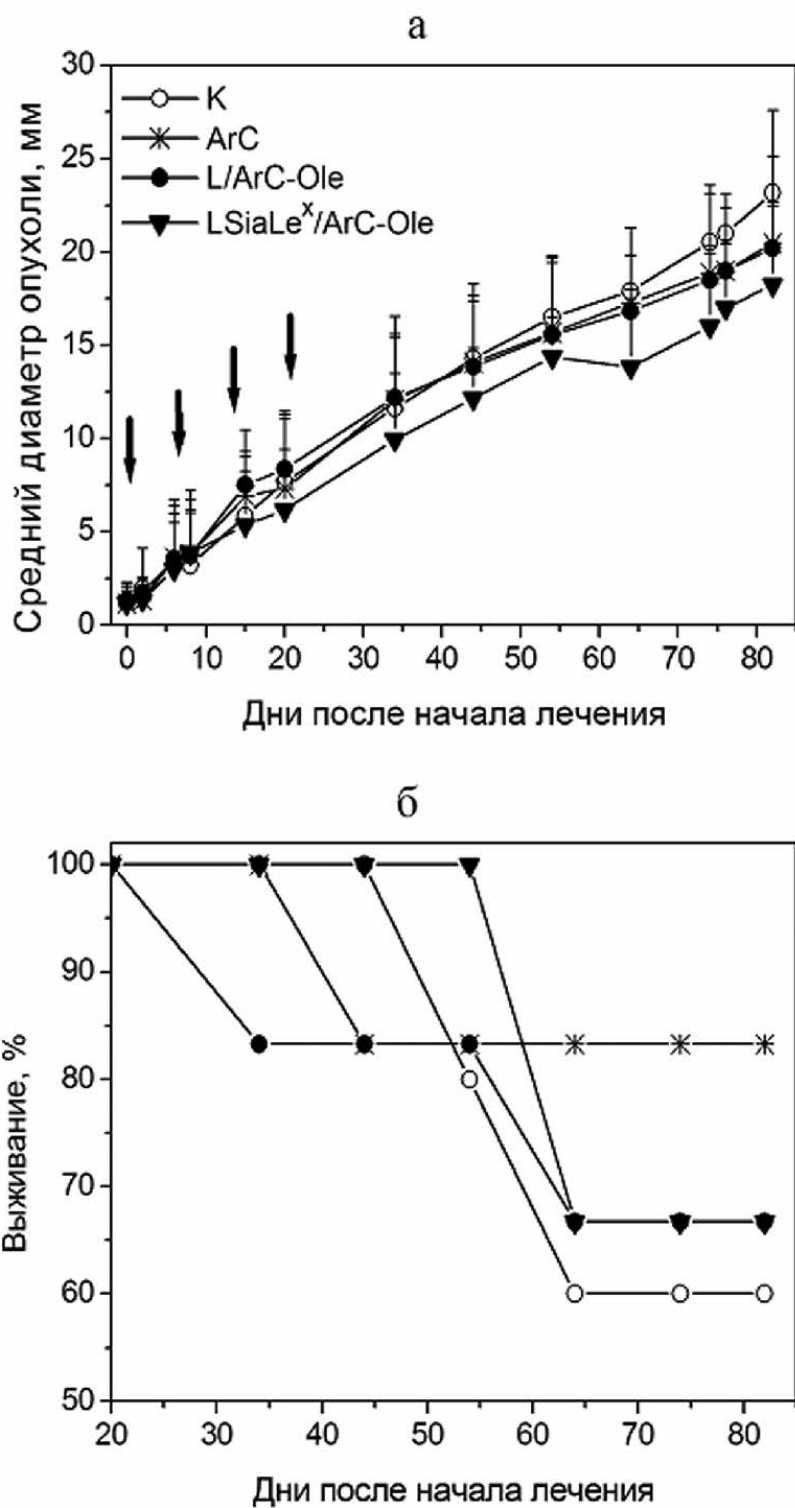
Таким образом, в используемых дозировке (22 мг/кг) и протоколе введения цитостатик СА-4 не оказал противоопухолевого действия и даже стимулировал рост РМЖ. Липосомальные формы СА4-Ole не оказывали стимулирующего действия на рост опухолей. Отсутствие противоопухолевой активности цитостатика СА-4 может быть связано с недостаточно высокой дозой. Так, в работе Pattillo с соавторами [14], однократная инъекция СА4Р в дозировке, принятой в клинике (81 мг/кг), мышам с перевитым РМЖ МСа-4 не ингибировала рост опухоли. Заметное ингибирование достигалось лишь при введении препарата после облучения (примерно на 30% в первые 10 дней), причём кривая роста опухоли практически совпадала с кривой, полученной после облучения без применения какого-либо препарата. Очень близкий уровень торможения роста опухоли показали мыши, получившие 4 инъекции СА4Р через день в той же дозе. Сильное ингибирование роста РМЖ (примерно на 80% в течение 15-20 дней) было достигнуто в результате введения СА4Р (15 мг/кг) в Stealth®-иммунолипосомах, несущих mAb к Е-селектину, причем только после облучения опухоли, которое значительно увеличивало экспрессию селектинов [14]. Без облучения действие иммунолипосом на рост опухолей практически не отличалось от действия СА4Р после облучения (см. выше), но доза вводимого в липосомах препарата была меньше в 5,4 раза [14]. Отметим, что в цитируемой работе испытания проведены на модели быстро растущего РМЖ (за 10 дней после начала лечения в контрольной группе опухоли выросли в объеме от 1 см<sup>3</sup> до 4 см<sup>3</sup>) [14]. Из клинической практики известно, что быстро растущие агрессивные опухоли более чувствительны к химиотерапии [25]. В нашей работе использована модель медленно растущего РМЖ, которая ближе отражает соответствующее заболевание человека.

Во втором эксперименте были испытаны различные препараты на основе 4-арилкумаринового аналога СА-4. Препарат ArC вводили в дозе 37 мг/кг, что в молярном исчислении соответствует двухкратной дозе СА-4 в 22 мг/кг. При этом ArC-Ole в липосомальных формах вводили в дозе 1/3 (мол.) от эквивалентной по ArC, поскольку при 7%-ной ёмкости липосом увеличение дозы ArC-Ole привело бы к необходимости вводить чрезмерно большое количество матричных фосфолипидов и SiaLe<sup>x</sup>-PEG-DG. В итоге, доза липосомального ArC-Ole была в 1,5 раза ниже дозы липосомального СА4-Ole в молярном исчислении (таблица).

На рисунке 4 приведены динамика роста опухоли и динамика выживания по группам мышей. Препарат ArC и его липосомальный аналог ArC-Ole не влияли на рост опухоли, а нацеленная форма с SiaLe<sup>x</sup> оказывала подавляющий эффект на рост опухоли уже после второго введения (рис. 4а). Достоверных различий по выживанию между группами не было (рис. 4б). Различия в СПЖ и проценту живых самок на 96 день эксперимента не были достоверными, однако имелась тенденция к лучшему выживанию животных, получавших ArC (рис. 4б и таблица). Интересно, что в отличие от СА-4, препарат не вызывал геморрагии в опухоли.

Мы полагаем, что использованные препараты способны проявить существенные противоопухолевые свойства при более продолжительном введении или при введении до появления пальпируемых опухолей, то есть сразу после перевивки опухолевых клеток.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** В настоящей работе предложена новая липосомальная конструкция, несущая антимиотический агент комбретастин А4 в виде липофильного пролекарства. Применение СА-4 в качестве антивазкулярного противоопухолевого средства для системного введения может быть усовершенствовано за счёт включения его липофильного пролекарства в липосомы, оснащенные специфическим для сосудистого эндотелия опухолей углеводным лигандом SiaLe<sup>x</sup>. Для получения выраженного противоопухолевого эффекта необходимо увеличить кратность введения препаратов липосом. Для усиления действия липосом с SiaLe<sup>x</sup>-лигандом желательно вводить их после облучения опухоли, как это показано в работе [14].



**Рисунок 4.**

Динамика роста опухоли (а) и динамика выживания (б) по группам мышей при лечении препаратами 4-арилкумарина. Модель РМЖ и режим введения препаратов см. в подписи к рисунку 3. Группы: контроль PBS (K, n=5), раствор ArC (37 мг/кг) в PBS-5% Твин-80 (ArC, n=6), ArC-Ole в 1/3 эквивалентной дозы в липосомах (L/ArC-Ole, n=6) или в SiaLe<sup>x</sup>-липосомах (LSiaLe<sup>x</sup>/ArC-Ole, n=6).

Новый антимиотический агент, аналог СА-4 – 4-арилкумарин ArC, показал меньший на порядок уровень цитотоксичности в культуре клеток рака молочной железы человека. Тем не менее, при испытаниях на мышинной модели медленно растущего РМЖ полученный аналог показал противоопухолевый эффект в двухкратной эквивалентной дозе по СА-4. Сам СА-4 в этих условиях противоопухолевого действия не оказывал.

Для получения липосомальных препаратов на основе 4-арилкумарина, по аналогии с СА-4 синтезировано липофильное пролекарство ArC-Ole. Результаты испытаний на мышинной модели РМЖ показывают перспективность применения ArC-Ole в липосомах, оснащенных SiaLe<sup>x</sup>. Необходим дальнейший подбор доз и режимов введения ArC и препаратов липосом с ArC-Ole.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 09-03-00647-а и № 10-04-01021-а), а также Совета по грантам Президента РФ для государственной поддержки молодых ученых и средств для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (грант МД-5606.2010.3).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Thorpe P.E. (2004) Clin. Cancer Res., **10**, 415-427.
2. Grosios K., Holwell S.E., McGown A.T., Pettit G.R., Bibby M.C. (1999) Br. J. Cancer., **81**, 1318–1327.
3. Fenske D.B., Cullis P.R. (2008) Expert Opin. Drug Deliv., **5**, 25-44.
4. Maeda H., Sawa T., Konno T. (2001) J. Control. Release, **74**, 47-61.
5. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. (1995) Science, **267**, 1275-1276.
6. Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. (2003) Clin. Pharmacokinet., **42**, 419-436.
7. Zucker D., Marcus D., Barenholz Y., Goldblum A. (2009) J. Control. Release, **139**, 73–80.
8. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А., Хуцян С.С., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. (2008) Рос. нанотехнологии, **3**(3-4), 162-172.
9. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I., Kadykov V., Gaenko G., Molotkovsky J., Vodovozova E. (2009) J. Drug Deliv. Sci. Techn., **19**, 51–59.
10. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Сыркин А.Б. (1997) Бюлл. exper. биол. мед., **123**, 439-441.
11. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. (2000) Eur. J. Cancer, **36**, 942–949.
12. Ehrhardt C., Kneuer C., Bakowsky U. (2004) Adv. Drug. Deliv. Rev., **56**, 527–549.
13. Tsuruta W., Tsurushima H., Yamamoto T., Suzuki K., Yamazaki N., Matsumura A. (2009) Biomaterials, **3**, 118–125.
14. Pattillo C.B., Venegas B., Donelson F.J., Valle L.D., Knight L.C., Chong P.L.G., Kiani M.F. (2009) Pharm. Res., **26**, 1093-100.
15. Nallamotheu R., Wood G., Pattillo C.B., Scott R.C., Kiani M.F., Moore B.M., Thoma L.A. (2006) AAPS PharmSciTech., **7**(2), E1-E10.
16. Bailly C., Bal C., Barbier P., Combes S., Finet J.-P., Hildebrand M.-P., Peyrot V., Wattez N. (2003) J. Med. Chem., **46**, 5437-5444.
17. Ganina O.G., Daras E., Bourgarel-Rey V., Peyrot V., Andresyuk A.N., Finet J.-P., Fedorov A.Yu., Beletskaya I.P., Combes S. (2008) Bioorg. Med. Chem., **16**, 8806-8812.
18. Rappl C., Barbier P., Bourgarel-Rey V., Gregoire C., Gilli R., Carre M., Combes S., Finet J.-P., Peyrot V. (2006) Biochemistry, **45**, 9210-9218.
19. Tron G.C., Pirali T., Sorba G., Pagliai F., Busacca S., Genazzani A. (2006) J. Med. Chem., **49**, 3033-3044.



20. Lara-Ochoa F., Espinosa-Pérez G. (2007) Tetrahedron Lett., **48**, 7007-7010.
21. Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R. (1986) Biochim. Biophys. Acta, **858**, 161-168.
22. Funaki N.O., Tanaka J., Kohmoto M., Sugiyama T., Ohshio G., Nonaka A., Yotsumoto F., Takeda Y., Imamura M. (2001) Oncol. Rep., **8**, 527-532.
23. Gabizon A., Papahadjopoulos D. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 6949-6953.
24. Romberg B., Metselaar J.M., Baranyi L., Snel C.J., Bunger R., Hennink W.E., Szebeni J., Storm G. (2007) Int. J. Pharm., **331**, 186-189.
25. Bonetti A., Zaninelli M., Rodella S., Molino A., Sperotto L., Piubello Q., Bonetti F., Nortilli R., Turazza M., Cetto G.L. (1996) Breast Cancer Res. Treat., **38**, 289-297.

Поступила: 31. 08. 2010.

# **LIPOSOME FORMULATIONS OF COMBRETASTATIN A4 AND 4-ARYLCOUMARIN ANALOG PRODRUGS: ANTITUMOR EFFECT IN THE MOUSE MODEL OF BREAST CANCER**

*E.V. Moiseeva<sup>1</sup>, N.R. Kuznetsova<sup>1</sup>, E.V. Svirshchevskaya<sup>1</sup>, N.V. Bovin<sup>1</sup>, N.S. Sitnikov<sup>2</sup>,  
A.S. Shavyrin<sup>3</sup>, I.P. Beletskaya<sup>4</sup>, S. Combes<sup>5</sup>, A.Yu. Fedorov<sup>2</sup>, E.L. Vodovozova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow V-437, GSP, 117997 Russia; phone +7 495 330 6610; fax +7 495 330 6601; e-mail: elvod@ibch.ru

<sup>2</sup>N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>3</sup>G.A. Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>4</sup>Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>5</sup>UMR-CNRS 6264, Saint Jerome Department of Sciences, Aix-Marseille University 1 and 2, Marseille, Cedex 20, France

The antimitotic agent combretastatin A4 (CA-4) has been suggested as an antivascular agent for anticancer therapy relatively recently. To reduce systemic toxicity by means of administration in liposome formulations, in this study new lipophilic prodrugs, oleic derivatives of CA-4 and its 4-arylcoumarin analog (CA4-Ole and ArC-Ole, respectively), have been synthesized: Liposomes of 100 nm mean diameter prepared on the basis of egg phosphatidylcholine and phosphatidylinositol from bakers yeast have been shown to include completely up to 10 mol. % of CA4-Ole, or 7 mol. % of ArC-Ole. Also, prodrug bearing liposomes decorated with tetrasaccharide selectin ligand Sialyl Lewis X (SiaLe<sup>x</sup>) have been constructed to achieve targeting to endothelium under neovascularization. The antitumor activity *in vivo* was studied in the model of slowly growing mouse breast cancer. Under the used dose (22 mg/kg) as well as the regimen of treatment (four injections, one per a week, starting from the appearance of palpable tumors) cytostatic CA-4 did not reveal any anticancer effect, and oppositely even stimulated tumor growth. Liposome formulations of CA4-Ole did not show such stimulation. However, to achieve pronounced antitumor effect, number of injections of liposomes should be apparently elevated. New antimitotic agent ArC revealed cytotoxic activity of only one tenth value obtained for CA-4 *in vitro* in the culture of human breast carcinoma cells. Nevertheless, *in vivo* in the mouse model of breast cancer this compound showed antitumor effect under double CA-4 equivalent dose. The results demonstrate availability of SiaLe<sup>x</sup>-liposomes loaded with ArC-Ole: this preparation began to inhibit tumor growth already after the second injection. It is necessary further to choose doses and regimens of administration both for ArC and liposome formulations bearing ArC-Ole.

**Key words:** combretastatin A4, 4-arylcoumarins, lipophilic prodrugs, liposomes, Sialyl Lewis X, breast cancer.