

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.2; 577.1

### ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ КОМПОЗИЦИЙ ДОКСОРУБИЦИНА В СОСТАВЕ КОЛЛОИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ С АДРЕСНЫМ ФРАГМЕНТОМ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

*М.А. Санжаков, Д.В. Игнатов, Л. В. Кострюкова, О.С. Дружиловская,  
Н.В. Медведева\*, В.Н. Прозоровский, О.М. Ипатова*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ),  
119121, Москва, Погодинская ул., 10; тел.: +7(499)2469491; +7(495)7083807;  
эл. почта: nmedvedeva@ibmc.msk.ru

Одним из подходов для улучшения фармакокинетики лекарственных соединений, увеличения их накопления в очаге поражения, а следовательно, повышения специфической активности, является использование систем направленного транспорта. В настоящей работе получены и охарактеризованы лекарственные композиции доксорубина, снабженные адресными конъюгатами на основе фолиевой кислоты и биотина с додециламином. Встраивание адресных фрагментов в коллоидные наночастицы осуществляли без модификации доксорубина и поверхности транспортных наносистем. В экспериментах *in vivo* произведено сравнение накопления антибиотика антрациклинового ряда доксорубина в опухоли Льюис, инокулированной мышам, после его внутривенного введения в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами биотин-додециламин и фолиевая кислота-додециламин. Показано, что накопление доксорубина в опухолевой ткани при его введении в составе лекарственных композиций с адресными фрагментами в 2 раза выше для конъюгата фолиевая кислота-додециламин в сравнении со свободным доксорубином и в 1,4 раза выше в сравнении с доксорубином, введенным в составе наночастиц с адресным фрагментом биотин-додециламин.

**Ключевые слова:** направленный транспорт, фолиевая кислота, биотин, додециламин, накопление в опухоли

**DOI:** 10.18097/PBMC20166202150

## ВВЕДЕНИЕ

Специфическая активность лекарств напрямую зависит от их способности накапливаться в очаге воспаления/поражения. Начиная со второй половины прошлого века, интенсивно развивается направление, в котором для хорошо зарекомендовавших себя в клинической практике лекарственных веществ разрабатываются транспортные наносистемы, обеспечивающие биологически активному соединению защиту от преждевременной деградации, увеличение времени циркуляции в кровотоке, повышенную биодоступность [1, 2]. Улучшенная фармакокинетика способствует увеличению накопления в области поражения/воспаления, а следовательно, повышению терапевтической эффективности и снижению побочных проявлений. Разработка систем направленного транспорта лекарств в настоящее время охватывает практически все области медицины (эндокринология, пульмонология, кардиология, онкология и т.д.).

Судьба лекарств, снабженных наносистемами транспорта, в кровотоке определяется их взаимодействием с компонентами крови, клетками тканей-мишеней и здоровых тканей [3-6]. Для опухолевых тканей и областей воспаления характерен “эффект повышенной проницаемости и удерживания” (enhanced permeability and retention, EPR) [7]. За счёт повышенной проницаемости кровеносных сосудов в сочетании с меньшим лимфатическим дренажом происходит увеличение накопления лекарства в проблемных областях. Этот эффект получил название пассивный

направленный транспорт [8]. При этом накопление лекарства в тканях определяется физико-химическими характеристиками транспортных наночастиц (размер, форма, поверхностный заряд), не обладающих специфичностью взаимодействия с клетками-мишенями [8]. Увеличение специфичности накопления в очаге воспаления может быть достигнуто за счёт модификации лекарства или системы его транспорта адресными фрагментами, обладающими высокой афинностью к определённым мишеням (клеткам, тканям). Такой подход в литературе называют активным направленным транспортом [6, 8].

При конструировании композиций для активного направленного транспорта адресный фрагмент может быть связан либо непосредственно с молекулой лекарственного соединения, либо с поверхностью наночастицы, транспортирующей лекарство. Однако модификация молекулы лекарственного соединения может оказать существенное влияние на его специфическую активность, а химическая модификация поверхности транспортной наночастицы может повлиять на её стабильность и транспортные свойства.

В ИБМХ на основе фосфатидилхолина была разработана наносистема пассивного транспорта с диаметром частиц 20-25 нм. Для ряда лекарств (доксорубин, рифампицин, будесонид, хлорин е6, преднизолон и др.), снабженных этой наносистемой, было экспериментально доказано существенное увеличение биодоступности и специфической активности за счёт повышенного накопления

лекарственной субстанции в очаге поражения [9-11]. Для повышения специфичности накопления лекарств, снабженных разработанной системой транспорта, было предложено снабдить её адресным фрагментом. С этой целью был разработан подход, при котором с использованием оригинальной технологии лекарство и адресный фрагмент встраивали в систему транспорта без модификации лекарственной молекулы или поверхности наночастицы [12].

В качестве векторов были выбраны фолиевая кислота и биотин, экспрессия рецепторов к которым на поверхности опухолевых тканей повышена [13]. Для обеспечения встраивания адресного конъюгата в фосфолипидный бислой нами были синтезированы конъюгаты фолиевой кислоты и биотина с додециламином [12], структурные формулы которых представлены на рисунке 1.

Целью настоящей работы было оценить специфичность накопления антибиотика антрациклинового ряда доксорубина в опухоли Льюиса, иннокулированной мышам, после его внутривенного введения в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами биотин-додециламин и фолиевая кислота-додециламин.

## МЕТОДИКА

В работе использовали нормализованный солевой фосфатный буфер PBS ("ПанЭко", Россия), растворители для ВЭЖХ и масс-спектрометрического анализа высокой степени чистоты: метанол – HPLC grade ("Fisher Scientific", Великобритания); ацетонитрил – HPCL for UV ("Acros organic", США); муравьиную кислоту 98-100% ("Merck", Германия); трифторуксусную кислоту ("Fluka Chemie", Швейцария), лекарственную субстанцию доксорубина гидрохлорид ("Long Cheng", Китай).

Лекарственную композицию доксорубина в составе коллоидных наночастиц, снабженных адресными фрагментами на основе фолиевой кислоты и биотина, в виде лиофильно высушенного порошка, получали согласно ранее описанной методике [13]: субстанцию растительных фосфолипидов Lipoid S100 ("Lipoid GmbH", Германия) суспендировали в 10% растворе мальтозы (25 мг/мл фосфолипида), добавляли адресный фрагмент (0,1 мг/мл) и доксорубина гидрохлорид (2,5 мг/мл). Суспензию гомогенизировали с использованием микрофлюидизера M110EN30K ("Microfluidics", США) под давлением 1000 атм при температуре 42-45°C, проводя 5-7 циклов гомогенизации. Полученную ультратонкую эмульсию разливали во флаконы по 10 мл и лиофилизировали

с использованием установки VirTis AdVantage XL ("VirTis", США). Полученные образцы после разведения водой характеризовали по размеру частиц и дзета-потенциалу, определяемых методами динамического и электрофоретического рассеяния света на анализаторе Zetasizer Nano ZS ("Malvern", Великобритания) с использованием программного обеспечения Zetasizer Software 6.20 ("Malvern").

Для экспериментов готовили водные растворы свободного доксорубина и доксорубина в составе коллоидных наночастиц на основе фосфатидилхолина с адресным конъюгатом фолиевая кислота-додециламин и биотин-додециламин с концентрацией 3 мг/мл по доксорубину.

Сравнительное исследование накопления доксорубина в ткани опухоли было проведено на мышах. Животные были получены из центрального питомника лабораторных животных ПАМН. В работе использовали мышей гибридов BDF<sub>1</sub> (самцы). Вес животных составлял (25±3) г. Перед экспериментом мышей выдерживали в течение 5-7 дней в стандартных условиях (12-ти часовой световой день, температура поддерживалась на уровне 20°C). Животные получали сухой брикетированный корм для мышей и крыс (ООО "МЭСТ"). В качестве опухолевой модели использовали животных с привитой карциномой легкого Льюиса (LLC). Опухолевая модель LLC получена из банка Российского онкологического научного центра имени Н.Н. Блохина. Карциному лёгкого Льюиса (LLC) мышам BDF<sub>1</sub> самцам прививали, вводя подкожно в подмышечную область опухолевую взвесь 1:10 в питательной среде 199 с глутамином (100 мг/л) в объёме 0,4 мл. Развитие опухоли происходило в течение 7-10 дней.

Растворы, содержащие доксорубин в свободном виде или в составе коллоидных наночастиц с адресными фрагментами, вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг по доксорубину в объёме 120-150 мкл (в зависимости от массы животного). Для каждой лекарственной формы накануне эксперимента животных случайным образом делили на соответствующие вводимым препаратам группам по три животных на каждую временную точку. Через 3, 6 и 24 ч после введения лекарственных препаратов животных подвергали эвтаназии путём декапитации. Для последующих анализов на содержание доксорубина производили забор крови в пробирки с ЭДТА ("Sarstedt", Германия) и вырезали опухоль.

Пробоподготовку образцов крови проводили следующим образом: 50 мкл крови переносили

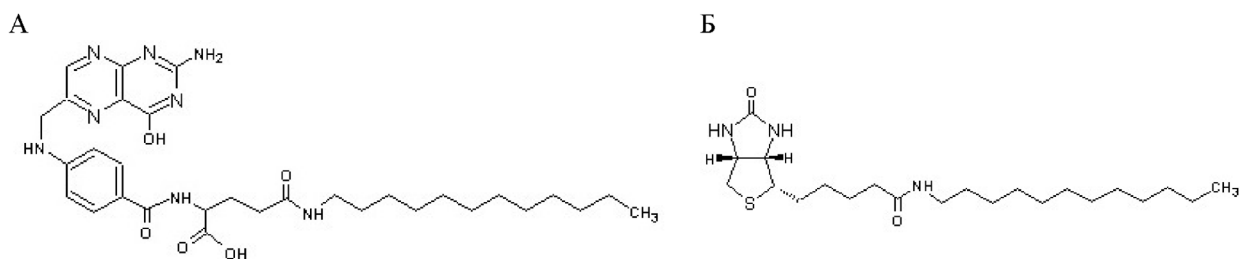


Рисунок 1. Структурные формулы конъюгатов фолиевая кислота-додециламин (А) и биотин-додециламин (Б).

в пробирку типа эппендорф на 2 мл, добавляли 150 мкл водного раствора 0,1% муравьиной кислоты. Белки осаждали добавлением 750 мкл ацетонитрила с перемешиванием на ультразвуковой бане Sonorex digital 10P ("Bandelin", Германия) и последующим центрифугированием при 10000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5810R в роторе F-45-30-11 в течение 15 мин. Супернатант переносили в вials и анализировали на содержание доксорубина.

Для анализа содержания доксорубина в опухолевой ткани к навеске ( $100 \pm 5$ ) мг добавляли 300 мкл водного раствора 0,1% муравьиной кислоты, гомогенизировали в течение 30 с ультразвуком на у/з дезинтеграторе Sonopuls HD 2070/2200 ("Bandelin", Германия) со стержнем MS-72 при 20% мощности. Белки осаждали добавлением к 250 мкл полученного гомогената 750 мкл ацетонитрила с перемешиванием на ультразвуковой бане с последующим центрифугированием при 10000 об./мин на центрифуге Eppendorf 5810R в роторе F-45-30-11 в течение 15 мин. Супернатант переносили в вials и анализировали на содержание доксорубина.

Анализ содержания доксорубина (ДОКС) осуществляли с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 Series с масс-спектрометрическим детектором Quadrupole LC/MS 6130 фирмы "Agilent Technologies" (США) с программным обеспечением Agilent LC/MSD ChemStation B.03.02-SR2. Колонка Eclipse XDB-C18 с размером  $4,6 \times 150$  мм и дисперсностью сорбента 5 мкм ("Agilent Technologies"). Подвижная фаза: 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил с 0,1% муравьиной кислоты (В). Скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин. Хроматографирование проводили при следующих условиях: линейный градиент В от 10 до 90% за 10 мин, затем в течение 1 мин концентрацию раствора В снижали до 10%. Объём вводимого образца – 10 мкл. Детектирование молекулярного иона доксорубина с  $m/z$  544,2. Пик, соответствующий этой массе, имел время удерживания 8,5 мин.

Для количественного определения содержания доксорубина в исследуемых экстрактах была построена калибровочная зависимость площади соответствующего пика от концентрации доксорубина в образце в интервале концентраций от 10 нг/мл до 10 мкг/мл. В указанном диапазоне концентраций зависимость была линейна и описывалась уравнением  $S = 167104,86 \times C - 4316,13$  ( $R=0,99997$ ), где  $S$  – площадь пика,  $C$  – концентрация доксорубина в образце.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки накопления противоопухолевого антибиотика доксорубина в опухоли были получены лекарственные композиции на основе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин и биотин-додециламин. В таблице приведены результаты, полученные методом динамического светорассеяния, по определению

размера и дзета-потенциала лиофильно высушенных композиций после разведения водой: размер частиц лекарственных композиций доксорубина в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин (ФД) и биотин-додециламин (БД) не превышал 20 нм, плотность поверхностного заряда (дзета потенциал) частиц была положительна и составляла 20,9 и 14,3 мВ, соответственно.

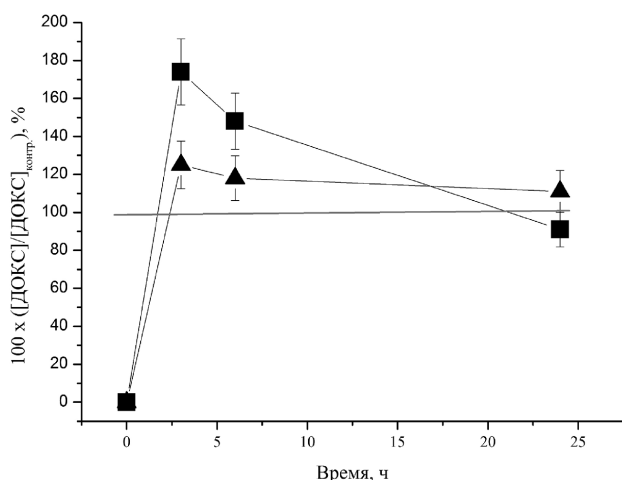
Сравнение накопления доксорубина (ДОКС), введенного внутривенно экспериментальным животным с инокулированной опухолью Льюис в свободном виде и в составе коллоидных наночастиц с адресными фрагментами, было изучено при дозе 5 мг/кг по доксорубину – половинная летальная доза, традиционно используемая в экспериментах *in vivo*. При этом через 3 ч для исследуемых лекарственных форм доксорубина концентрация ДОКС в крови имеет тенденцию к снижению в ряду ДОКС<sub>своб.</sub> → ФХ-ДОКС-ФД → ФХ-ДОКС-БД. Это может свидетельствовать о более быстрой абсорбции доксорубина, снабженного транспортной системой с адресными фрагментами, органами и тканями организма. Через 6 и 24 ч содержание ДОКС в крови для трёх исследованных форм практически одинаково (данные не приведены).

На рисунке 2 приведены результаты по определению содержания доксорубина в ткани опухоли экспериментальных животных после внутривенного введения доксорубина в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин и биотин-додециламин по отношению к соответствующему значению в группе животных, которым вводили свободный ДОКС (принято за 100%). Из рисунка 2 видно, что через 3 ч и 6 ч в группе животных, которым вводили ДОКС в составе фосфолипидных наночастиц в адресным конъюгатом фолиевая кислота-додециламин (ФХ-ДОКС-ФД), отличие в содержании лекарства в опухолевой ткани от контроля (введение свободного ДОКС) было более выражено, чем у животных, которым вводили ДОКС в составе фосфолипидных наночастиц с адресным конъюгатом биотин-додециламин (ФХ-ДОКС-БД). Через 24 ч накопление ДОКС в опухоли было практически одинаково для трёх групп животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что содержание доксорубина в опухолевой ткани, введенного в составе ФХ-ДОКС-ФД (вектор – фолиевая кислота), почти в два раза больше, чем в контроле и в 1,4 раза выше, чем при введении доксорубина в составе ФХ-ДОКС-БД (вектор – биотин). Увеличение накопления доксорубина возможно:

- за счёт величины дзета-потенциала транспортной наночастицы (дзета потенциал ФХ-ДОКС-ФД больше, чем у ФХ-ДОКС-БД, что, по-видимому, способствует лучшему взаимодействию частиц ФХ-ДОКС-ФД с отрицательно заряженными клетками опухоли;

- вследствие повышенной экспрессии рецепторов к фолиевой кислоте на клетках исследуемых опухолей в сравнении с количеством рецепторов к биотину.



**Рисунок 2.** Содержание ДОКС в опухолевой ткани в зависимости от времени после внутривенного введения в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин (квадраты) и биотин-додециламин (треугольники) по отношению к соответствующему значению для свободного ДОКС, принятого за 100%.

## ВЫВОДЫ

Накопление доксорубина в ткани опухоли Льюис у мышей повышается при введении его в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами: содержание в опухоли доксорубина, введенного внутривенно в составе наночастиц с адресным фрагментом фолиевая кислота-додециламин почти в 2 раза выше в сравнении со свободным доксорубином и в 1,4 раза выше в сравнении с доксорубином, введенным в составе наночастиц с адресным фрагментом биотин-додециламин.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60414X0021).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gurram A.K., Deshpande P.B., Kar S.S., Nayak U.Y., Udupa N., Reddy M.S. (2015) Indian J. Pharm. Sci., **77**, 249-257.
2. Qasim M., Lim D.J., Park H., Na D. (2014) J. Nanosci. Nanotechnol., **14**, 7374-7387.
3. Wasan K.M., Vadiel K., Lopez-Berestein G., Luke D.R. (1990) J. Infect. Dis., **161**, 562-566.
4. Wasan K.M., Brazeau G.A., Keyhani A., Hayman A.C., Lopez-Berestein G. (1993) Antimicrob. Agents Chemother., **37**, 246-250.
5. Wasan K.M., Lopez-Berestein G. (1994) J. Drug Targeting, **2**, 373-380.
6. Chauvin B., Iorga B.I., Chaminade P., Paul J.L., Maillard P., Prognon P., Kasselouri A. (2013) Eur. J. Pharm. Biopharm., **83**, 244-252.
7. Cerqueira B.B., Lasham A., Shelling A.N., Al-Kassar R. (2015) Eur. J. Pharm. Biopharm., **97**(Pt A), 140-151.
8. Watkins R., Wu L., Zhang C., Davis R.M., Xu B. (2015) Int. J. Nanomedicine, **10**, 6055-6074.
9. Ипатова О.М., Зыкова М.Г., Прозоровский В.П., Торховская Т.П., Захарова Т.С. (2009) Биомед. химия, **55**, 185-194.
10. Широнин А.С., Ипатова О.М., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Тихонова Е.Г., Торховская Т.П. (2012) Эфферентная и физико-химическая медицина, №1, 21-24.
11. Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Игнатов Д.В., Дружилловская О.С., Кудинов В.А., Касаткина Е.О., Тихонова Е.Г., Ипатова О.М. (2015) Биомед. химия, **61**, 219-230.
12. Санжаков М.А., Игнатов Д.В., Прозоровский В.Н., Дружилловская О.С., Медведева Н.В., Ипатова О.М. (2014) Биомед. химия, **60**, 713-716.
13. Russell-Jones G., McTavish K., McEwan J., Rice J., Nowotnik D. (2004) J. Inorg. Biochem., **98**, 1625-1633.

Поступила: 21. 12. 2015.  
Принята к печати: 29. 02. 2016.

## THE *IN VIVO* STUDY OF THE MEDICINAL COMPOSITION PROPERTY OF DOXORUBICIN AS A PART OF COLLOIDAL NANOPARTICLES WITH THE ADDRESS FRAGMENT

M.A. Sanzhakov, D.V. Ignatov, L.V. Kostyukova, O.S. Druzhilovskaya,  
N.V. Medvedeva, V.N. Prozorovskiy, O.M. Ipatova

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)2469491, +7(495)7083807;  
e-mail: nmedvedeva@ibmc.msk.ru

The use of targeted transport systems for drug delivery is a promising approach to improve pharmacokinetics of drug substances, accumulation in the lesion. In this study we have obtained and characterized the pharmaceutical composition of doxorubicin in colloidal nanoparticles equipped with targeted conjugates based on folic acid and biotin with dodecylamine. The inclusion of the address fragments into colloidal nanoparticle was carried out without surface and drug substance modification. The accumulation of anthracycline antibiotic doxorubicin in tumor tissue was compared in Lewis lung carcinoma mouse models after intravenous administration of the composition of colloidal nanoparticles with targeted conjugates biotin-dodecylamine and folic acid-dodecylamine or free doxorubicin. It was shown that the doxorubicin accumulation in tumor tissue when administered in drug compositions with targeted fragments are 2 times higher for the folic acid-dodecylamine conjugate and 1.4 times higher for the biotin-dodecylamine conjugate.

**Key words:** targeted delivery system, oncology, folic acid, biotin, dodecylamine, accumulation in the tumor