

С. В. Бабицкая, А. П. Власов, В. И. Долгопалец, М. В. Жукова, М. А. Кисель,
Б. Б. Кузьмицкий, А. Е. Машкович, В. М. Насек, О. В. Романенко, В. М. Шнигир

ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ ДОКСОРУБИЦИНА В ЛИПОСОМЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФОСФАТИДИЛЭТАНОЛ. II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ “ТВЕРДЫХ” ЛИПОСОМ

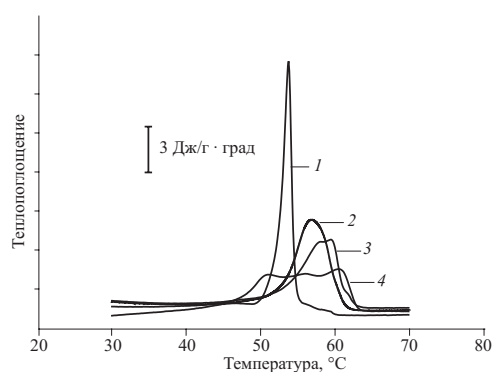
Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск

Проведено инкапсулирование доксорубина в “твердые” липосомы, состоящие из смеси дистеароильных аналогов фосфатидилхолина и фосфатидилэтанола в мольном соотношении 3:2 и стерически стабилизированные путем включения конъюгата дипальмитоилфосфатидилэтаноламина с полиэтиленгликолем-2000 (5 вес. % по отношению к суммарному липиду). Методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии установлено, что до температуры 47 °С липидный бислой доксорубин-содержащих липосом находится в гелеобразном (“твердом”) состоянии. Показано, что противоопухолевый эффект таких липосом, оцененный по ингибированию роста солидной и асцитной карциномы Эрлиха мышей, равен эффекту обычного доксорубина, тогда как стерически нестабилизированные “твердые” липосомы в 1,5 раза менее активны.

Известно, что липосомы, липидный бислой которых в районе 37 °С находится в гелеобразном состоянии (“твердые” липосомы), характеризуются по сравнению с жидкокристаллическими более высокой продолжительностью циркуляции в кровеносном русле за счет большей стабильности и низкого сродства к сывороточным опсонинам [1 – 3]. Можно ожидать, что увеличение периода циркуляции “твердых” липосом с инкапсулированным доксорубином будет сопровождаться их повышенным накоплением в злокачественной опухоли и, как следствие, возрастанием терапевтического эффекта. В продолжение исследований, выполненных на жидкокристаллических липосомах, целью этой работы было получение доксорубин-содержащих “твердых” липосом на основе смеси фосфатидилхолин/фосфатидилэтанола, их физико-химическая характеристика и изучение противоопухолевого действия такой липосомальной формы антибиотика.

Основываясь на калориметрических данных о температуре фазового перехода гель — жидкий кристалл (T_c) в ряду насыщенных молекулярных видов фосфатидилхолина [4], в качестве липидных компонентов “твердых” липосом были выбраны дистеароильные аналоги фосфатидилхолина (ДСФХ) и фосфатидил-этанола (ДСФЭТ). Микрокалориметрические исследования липосом из синтезированного нами ДСФХ показали, что фосфолипид обладает фазовым переходом при 54 °С (рис. 1, кривая 1) и этот параметр соответствует литературным данным [4]. Фазовый переход гель — жидкий кристалл ДСФЭТ характеризуется более низкой кооперативностью и протекает при 57 °С (рисунок, кривая 2). При смешивании ДСФЭТ с ДСФХ в весовом соотношении 2:3 на кривых теплопоглощения наблюдается разделение фаз (рисунок, кривая 3), которое, по-видимому, обусловлено преимущественной локализацией ДСФЭТ на внутренней поверхности бислоевой мембраны [5]. Однако величина T_c при этом не уменьшается и составляет 57,5 – 59,5 °С. Таким образом, смесь ДСФЭТ и ДСФХ при температуре тела животных находится в гелеобразном состоянии и, следовательно, может служить в качестве липидного компонента “твердых” липосом.

Для проведения биологических испытаний были получены два препарата липосом. Оба препарата содержали доксорубин, ДСФХ, ДСФЭТ в весовом соотношении 1:6:4, при этом один из них был стерически стабилизирован конъюгатом дипальмитоилфосфатидилэтаноламина с полиэтиленгликолем-2000 (ДПФЭ-ПЭГ), содержание которого составляло 5 вес. % относительно суммарного липида (ПЭГ-липосомы). Известно, что полярный остаток полиэтиленгликоля, выступающий над плоскостью бислоя, препятствует захвату липосом ретикулоэндотелиальной системой, снижает скорость их накопления в печени и селезенке [6, 7], тем самым повышая продолжительность циркуляции “твердых” липосом в кровеносном русле в 2 – 2,5 раза [8]. По данным флуориметрического анализа оба препарата липосом содержали более 85 % инкапсулированного доксорубина. Кривые теплопоглощения липосом (рисунок, кривая 4) характеризуются тремя пиками, которые могут быть отнесены к фазовым переходам пула липидов, не взаимодействующих с доксорубином, и пулов липидов, связывающих антибиотик по электростатическому (высокотемпературный пик) и гидрофобному (низкотемпературный пик) механизмам. Температурный интервал фазового перехода 47 – 63 °С дает основание считать, что после введения



Кривые теплопоглощения липосом из ДСФХ (1), ДСФЭТ (2), смеси ДСФХ/ДСФЭТ (3:2) (3) и доксорубин-содержащих ПЭГ-липосом (4)

Противоопухолевая активность обычного и инкапсулированного в “твердые” липосомы доксорубина на модели солидной опухоли Эрлиха у аутбредных мышей ICR

Группа животных, препарат	Разовая доза (мг/кг в/в), интервал между введениями в часах × число введений	Показатели торможения роста опухоли (ТРО) после окончания лечения ($\bar{x} \pm S_x$)			
		через 1 сут.		через 7 сут.	
		Средний объем опухоли	ТРО, р*	Средний объем опухоли	ТРО, р*
Контроль	1,2 % раствор лактозы	67,15 ± 3,81	—	115,4 ± 8,59	—
Доксорубин обычный	4/120 × 2	30,84 ± 2,21	54 %, < 0,001	44,4 ± 8,02	62 %, < 0,001
Доксорубин в стерически нестабилизированных “твердых” липосомах	4/120 × 2	48,9 ± 3,80	27 %, < 0,01	70,28 ± 10,61	39 %, < 0,01
Доксорубин в ПЭГ-липосомах	4/120 × 2	31,3 ± 3,4	53 %, < 0,001	42,12 ± 7,13	63 %, < 0,001

* уровень достоверности по сравнению с контролем.

липосом в кровотоке липиды в бислое будут находиться в гелеобразном состоянии.

Из результатов эксперимента, представленных в табл. 1, видно, что доксорубин в ПЭГ липосомах, в отличие от препарата в стерически нестабилизированных “твердых” липосомах, на модели солидной опухоли Эрлиха по эффективности не уступает таковой обычного препарата. Кроме того, противоопухолевая эффективность включенного в ПЭГ-липосомы доксорубина, оцененная по ингибированию размножения клеток асцитной карциномы Эрлиха, сравнима с эффективностью обычного препарата (табл. 2).

Таким образом, включение доксорубина в “твердые” липосомы, состоящие из стеариновых аналогов фосфолипидов и ДПФЭ-ПЭГ, обеспечивает стабилизацию липосом в кровеносном русле, что следует из данных по торможению роста солидной и асцитной форм карциномы Эрлиха.

Экспериментальная химическая часть

В экспериментах использовали монометиловый эфир полиэтиленгликоля-2000 (“Fluka”, Швейцария), доксорубин фирмы “Synbias Pharma Ltd” (Донецк, Украина). Калориметрические исследования липосом проводили на калориметре ДАСМ-1М со скоростью сканирования 1 °С/мин. ПМР-спектры записывали на приборе Bruker

AC200, спектры поглощения и флуоресценции — на приборах Specord M400 и Solar 1211A, соответственно.

ДСФХ получали ацилированием аддукта 3-*sn*-глицерофосфата с CdCl₂ имидазolidом стеариновой кислоты в соответствии с методикой, описанной в работе [9]. ДПФЭ синтезировали по методике, изложенной в работе [10].

ДСФЭТ получали из ДСФХ с помощью фосфолипазы D из капусты [11]. Реакцию проводили в течение 4 ч, по истечении каждого часа добавляя новую порцию фермента. Очистку ДСФЭТ осуществляли с помощью флэш-хроматографии на силикагеле. Выход ДСФЭТ (Na⁺-форма) 65 %. R_f 0,8.

ДПФЭ-ПЭГ получали следующим образом. Смесь 1,0 г (0,5 ммоль) монометилового эфира полиэтиленгликоля-2000, 1,0 г (10 ммоль) янтарного ангидрида и 1,0 г (8,2 ммоль) диметиламинопиридина в 10 мл сухого хлороформа перемешивали при комнатной температуре в течение 3 сут. Затем добавили 10 мл воды, перемешивали 4 ч, после чего смесь упаривали досуха. Остаток растворяли в 5 мл хлороформа и очищали флэш-хроматографией на силикагеле. Фракции, содержащие сукцинированный полимер, собирали и упаривали на роторном испарителе. Выход 1,0 г (95 %), R_f 0,34 (Al₂O₃, хлороформ–метанол, 10:1). Далее 0,7 г (0,33 ммоль) полученного продукта растворяли в 2 мл смеси ТГФ–ацетонитрил (1:1), содержащей 56 мкл (0,4 ммоль) триэтиламина, и охлаждали до –18 °С. Затем добавили 52 мкл (0,4 ммоль) бутилхлорформиата и реакционную смесь выдерживали 30 мин при –18 °С, после чего надосадочную жидкость отделяли и прибавили к смешанным мицеллам из 150 мг (0,22 ммоль) 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-этанолamina и 160 мг (0,44 ммоль) бромистого цетилтриметиламмония в 15 мл бикарбонатного буфера, pH 8,5, и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем добавили 10 мл воды, 30 мл смеси хлороформ – метанол (2:1) и полученную смесь интенсивно встряхивали в делительной воронке. После расслаивания водной и органической фаз нижний слой упаривали на роторном испарителе. Остаток растворяли в 5 мл хлороформа и очищали флэш-хроматографией на силикагеле. Фракции, содержащие продукт, собирали и упаривали на роторном испарителе. При проявлении ТСХ-пластинки продукт дает положительную реакцию с реагентом на фосфолипиды и отрицательную – с нингид-

Таблица 2
Противоопухолевая активность обычного и инкапсулированного в “твердые” стерически стабилизированные ДПФЭ-ПЭГ липосомы (ПЭГ-липосомы) доксорубина на модели асцитной карциномы Эрлиха у мышей

Группа животных, препарат	Разовая доза (мг/кг в/в), интервал между введениями в часах × число введений	Количество опухолевых клеток, × 10 ⁶	Торможение роста опухоли, %; р*
Контроль	1,2 % раствор лактозы /48 × 4	990,7 ± 103,7	—
Доксорубин в ПЭГ-липосомах	4/48 × 4	527,5 ± 141,8	47, < 0,05
Доксорубин обычный	4/48 × 4	513,3 ± 130,5	48, < 0,02

* уровень достоверности по сравнению с контролем.

рином. Выход 45 мг (20% в расчете на фосфатидилэтаноламин), R_f 0,75 (силикагель, хлороформ – метанол – вода, 65:25:4). ПМР-спектр ($CDCl_3$), δ , м.д.: 0,89 т (6H, $2CH_3$); 1,25 с (48H, $24CH_2$); 1,58 с (4H, $2CH_2CH_2COO$); 2,28 с (4H, CH_2COO); 2,66 м (4H, $COCH_2CH_2CO$); 3,40 с (3H, OCH_3); 3,64 с ($>180H$, $\cong 90 OCH_2$), 3,70 – 4,30 м (8H, CH_2CHCH_2 , $POCH_2CH_2N$), 5,15 (1H, CH_2CHCH_2).

Инкапсулирование доксорубина в липосомы проводили следующим образом. В круглодонную колбу, содержащую пленку фосфолипидов, образовавшуюся после упаривания хлороформа из раствора липидов на ротонном испарителе, добавляли необходимый объем водного раствора доксорубина в 1,2 % растворе лактозы, смесь нагревали до 65 °С и интенсивно встряхивали до полного диспергирования фосфолипида. Затем дисперсию обрабатывали на ультразвуковой бане под аргоном в течение 10 мин при 65 °С. Так как ПЭГ-липосомы не отделяются от свободного доксорубина при гель-проникающей хроматографии, определение степени инкапсулирования проводили с помощью диализа в 100-кратном объеме воды в течение 16 ч при постоянном перемешивании. Затем в диализате измеряли интенсивность флуоресценции доксорубина ($\lambda_{возб}$ 495 нм; $\lambda_{исп}$ 596 нм). Из калибровочного графика рассчитывали количество неинкапсулированного доксорубина в препарате.

Образцы для микрокалориметрии готовили разбавлением липосом до концентрации суммарного липида 0,5 мг/мл.

Экспериментальная биологическая часть

Противоопухолевую эффективность изучали на модели солидной карциномы Эрлиха. Асцитную жидкость, взятую от мышей-опухоленосителей, смешали с равным объемом раствора Хенкса. Опухолевые клетки в аликвоте асцита подкрасили 0,1 % раствором трипанового синего с целью определения жизнеспособных клеток. Мышам-самкам ICR массой $20,0 \pm 3,0$ г, распределенным по 7 – 10 особей в группу (2 опытные и 2 контрольные), имплантировали в складку кожи на боку по 10^7 опухолевых клеток в объеме 0,2 мл/мышь. Через 24 ч после имплантации мышам внутривенно вводили липосомальные формы доксорубина или обычный препарат. Противоопухолевый эффект тестируемых лекарственных форм доксорубина оценивали по ингибированию роста опухоли, степень которого определяли по показателю торможения роста опухоли (ТРО) через 1 и 7 сут после окончания лечения. ТРО вычисляли по формуле [12]:

$$TPO = \frac{V_k - V_o}{V_k} \times 100\%,$$

где V — средний объем опухоли (mm^3) в опытной и контрольной группах, соответственно, на конкретный срок.

Торможение роста клеток асцитной карциномы Эрлиха *in vivo* изучали в опытах на мышах-самках ICR массой $20,0 \pm 3,0$ г, распределенных по группам (7 – 10 особей в каждой). Всем животным имплантировали внутривенно по 2×10^6 клеток асцитной карциномы Эрлиха. Через 24 ч мышам опытной группы вводили липосомальные формы доксорубина из расчета 4 мг/кг внутривенно, группе животных позитивного контроля — обычный доксорубин. Животные негативного контроля получали плацебо. “Лечение” мышей-опухоленосителей продолжали четырехкратно через каждые 48 ч. На 9-й день опыта всех мышей умерщвляли, извлекали асцитическую жидкость и определяли количество жизнеспособных опухолевых клеток. Степень торможения развития опухолевого процесса рассчитывали по количеству опухолевых клеток $(K - O)/K \cdot 100\%$.

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Gregoriadis and J. Senior, *FEBS Lett.*, **119**(1), 43 – 46 (1980).
2. S. M. Moghimi and H. M. Patel, *Biochim. Biophys. Acta*, **984**(3), 384 – 387 (1989).
3. M. B. Bally, R. Nayar, D. Masin et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1023**(1), 133 – 139 (1990).
4. P. W. M. van Dijk, *Biochim. Biophys. Acta*, **555**(1), 89 – 101 (1979).
5. A. V. Victorov, N. Janes, T. F. Taraschi, and J. B. Hoek, *Biophys. J.*, **72**(6), 2588 – 2598 (1997).
6. A. L. Klivanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin, and L. Huang, *FEBS Lett.*, **268**(1), 235 – 237 (1990).
7. S. K. Huang, E. Mayhew, S. Gilani, et al., *Cancer Res.*, **52**(24), 6774 – 6781 (1992).
8. D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, et al., *Pharm. Rev.*, **51**(4), 691 – 743 (1999).
9. A. Hermetter and F. Paltauf, *Chem. Phys. Lipids*, **28**, 111 – 115 (1981).
10. H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**(9), 4074 – 4077 (1978).
11. A. A. Ахрем, А. П. Власов, М. С. Воробьев и др., *Хим.-фарм. журн.*, **28**(10), 34 – 37 (1994).
12. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Медицина, Москва (2000).

Поступила 11.08.04

ENCAPSULATION OF DOXORUBICIN IN LIPOSOMES CONTAINING PHOSPHATIDYLETHANOL. II. PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND ANTITUMOR ACTIVITY OF “SOLID” LIPOSOMES

S. V. Babitskaya, A. P. Vlasov, V. I. Dolgopalets, M. V. Zhukova, M. A. Kisel', B. B. Kuz'mitskii, A. E. Mashkovich, V. M. Nasek, O. V. Romanenko, and V. M. Shnigir

Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Doxorubicin has been encapsulated into “solid” liposomes composed of a mixture of distearoyl analogs of phosphatidylcholine and phosphatidylethanol (in a 3 : 2 molar ratio). The liposomes are sterically stabilized by incorporating a conjugate of dipalmitoylphosphatidylethanolamine with poly(ethylene glycol) 2000 (5 wt % with respect to the total lipid content). The data of differential scanning microcalorimetry method show that lipid bilayer of the doxorubicin-containing liposomes occurs in a gel-like (“solid”) state up to a temperature of 47 °C. Estimated in terms of inhibiting the growth of solid and ascitic Ehrlich's carcinoma in mice, the antitumor effect of such liposomes is equal to that of usual doxorubicin, whereas sterically non-stabilized “solid” liposomes are 1,5 times less active.