



*Дружиловская Оксана Сергеевна*

канд. биол. наук, научный сотрудник

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

г. Москва

*Санжаков Максим Александрович*

канд. биол. наук, научный сотрудник

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

г. Москва

*Касаткина Елена Олеговна*

консультант по научным вопросам

ООО «ИБМХ-Экобиофарм»

г. Москва

*Медведева Наталья Вилориковна*

канд. физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

г. Москва

*Прозоровский Владимир Николаевич*

д-р биол. наук, главный научный сотрудник

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт

биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»

г. Москва

## **ВЛИЯНИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА В КОЛЛОИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ С АДРЕСНЫМ ФРАГМЕНТОМ НА НАКОПЛЕНИЕ В ТКАНЯХ ОПУХОЛИ**

*Аннотация: современным подходом повышения специфичности накопления лекарств в области поражения является конструирование транспортных наносистем, снабжённых адресными фрагментами. Авторами исследовано*

*накопление доксорубицина (ДОКС) в опухоли Льюис у мышей при внутривенном введении его в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами додециламина и фолиевой кислоты (ФД) или биотина (БД). В сравнении со свободным ДОКС наблюдали двукратное повышение его накопления в опухоли при введении его в составе коллоидных наночастиц с адресным фрагментом ФД и в 1,4 раза – в составе наночастиц с фрагментом БД.*

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

Специфическая активность лекарства напрямую зависит от его способности накапливаться в очаге поражения. По механизмам, обеспечивающим накопление биологически активного вещества в очаге поражения, различают пассивный и активный направленный транспорт. Пассивный транспорт лекарства в ткани опухолей обеспечивается за счёт повышенной проницаемости кровеносных сосудов в сочетании с меньшим лимфатическим дренажом (enhanced permeability and retention, EPR) [1]. В настоящее время большое внимание уделяется конструированию наносистем доставки, обеспечивающих активный направленный транспорт за счёт снабжения их функциональными фрагментами, определяющими специфичность локализации и интернализации лекарства клетками-мишнями [2].

В ИБМХ на основе фосфатидилхолина была разработана наносистема пассивного транспорта лекарств с диаметром частиц 20–25 нм [3]. Для повышения специфичности накопления лекарств в тканях опухоли были синтезированы конъюгаты на основе додециламина и фолиевой кислоты (или биотина) [4]. Известно, что экспрессия рецепторов к витаминам (фолиевая кислота, биотин) на поверхности опухолевых клеток существенно повышена [5]. На основе ДОКС получены лекарственные композиции, представляющие собой коллоидные наночастицы фосфатидилхолина с адресными конъюгатами. Целью настоящей работы было исследовать влияние на специфичность накопления ДОКС в тканях опухоли после его внутривенного введения в составе коллоидных наночастиц с

адресными конъюгатами фолиевая кислота-додециламин и биотин-додециламин.

Эксперименты были проведены на мышах-гибридах BDF<sub>1</sub> (самцах) весом (25 ± 3) г, полученных из центрального питомника лабораторных животных РАМН. Карциному лёгкого Льюис (LLC) мышам BDF<sub>1</sub> самцам прививали введением опухолевой ткани (10 мг/мышь) подкожно в икроножную мышцу с внешней стороны бедра. Развитие опухоли происходило в течение 7–10 дней. Растворы, содержащие ДОКС в свободном виде или в составе коллоидных наночастиц с адресными фрагментами фолиевая кислота-додециламин (ФХ-ДОКС-ФД) и биотин-додециламин (ФХ-ДОКС-БД), вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг по ДОКС. Через 3, 6 и 24 часа после введения лекарственных препаратов наркотизированных животных подвергали эвтаназии.

Содержание ДОКС определяли в крови и опухолевой ткани экспериментальных животных 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, оснащённого автосамплером и колонкой Eclipse XDB-C18 с размером 4,6 × 150 мм и дисперсностью сорбента 5 мкм. Элюирование проводили смесью 0,1% водного раствора муравьиной кислоты и ацетонитрила с линейным градиентом ацетонитрила от 10 до 90% за 10 мин. Скорость потока подвижной фазы 0,5 мл/мин. ДОКС детектировали в виде молекулярного иона с m/z 544,2. Время удерживания 8,5 мин. Зависимость площади соответствующего пика (S) от концентрации (C) в интервале концентраций от 10 нг/мл до 10 мкг/мл имела линейный характер вида  $S = 167104,86 \times C - 4316,13$  ( $r^2 = 0,99997$ ).

Для определения содержания ДОКС в крови к 50 мкл крови добавляли 150 мкл водного раствора 0,1% муравьиной кислоты, затем 750 мкл ацетонитрила. Полученную смесь центрифугировали при 10000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5810R в роторе F-45–30–11 в течение 15 минут для осаждения белков, супернатант анализировали на содержание ДОКС. Для пробоподготовки опухолевой ткани к навеске (100 ± 5) мг опухолевой ткани добавляли 300 мкл водного

раствора 0,1% муравьиной кислоты, гомогенизировали течение 30 секунд на ультразвуковом дезинтеграторе Sonopuls HD 2070/2200 со стержнем MS-72 при 20% мощности (Bandelin Electronic, Германия). Полученный гомогенат разбавляли в 4 раза ацетонитрилом и центрифугировали для осаждения белков. Супернатант переносили в виалы и анализировали на содержание ДОКС.

На рисунках 1 и 2 приведены результаты по определению ДОКС в крови и опухоли экспериментальных животных при его введении в свободном виде, в составе коллоидных наночастиц фосфатидилхолин-фолиевая кислота-додециламин (ФХ-ДОКС-ФД) и фосфатидилхолин-биотин-додециламин (ФХ-ДОКС-БД).

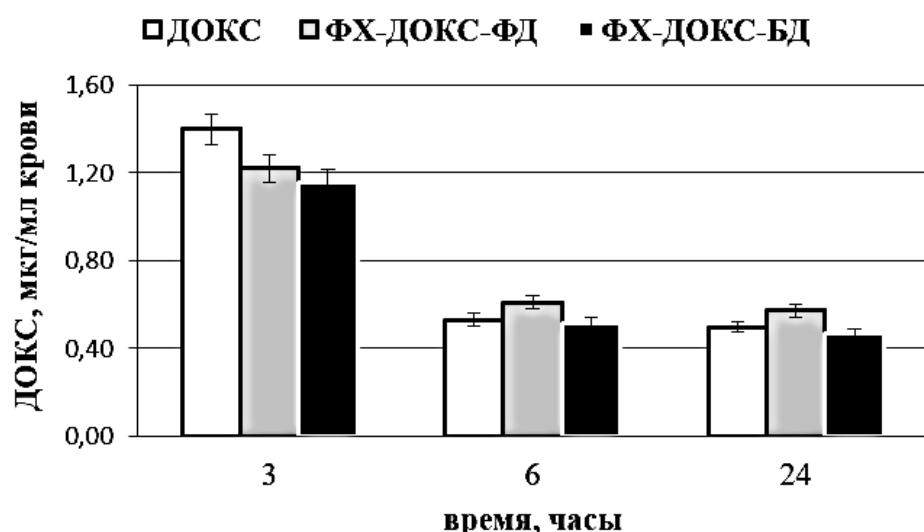


Рис. 1. Изменение содержания ДОКС в крови экспериментальных животных через 3, 6 и 24 часа после внутривенного введения исследуемых препаратов: свободного ДОКС (белые столбцы), ДОКС в составе коллоидных наночастиц с адресным конъюгатом фолиевая кислота-додециламин (ФХ-ДОКС-ФД – серые столбцы) и биотин-додециламин (ФХ-ДОКС-БД – чёрные столбцы). Доза по ДОКС 5 мг/кг.

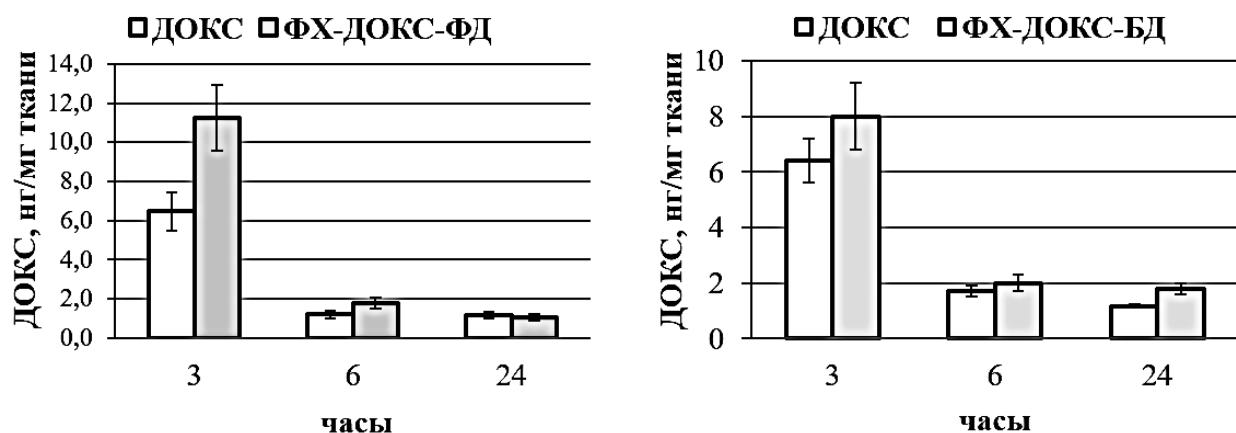


Рис. 2. Изменение содержания ДОКС в опухолевой ткани от времени после внутривенного введения его в свободном виде (белые столбцы) и в составе коллоидных фосфолипидных наночастиц с адресным коньюгатом фолиевая кислота-додециламин (ФХ-ДОКС-ФД – серые столбцы слева) и биотин-додециламин (ФХ-ДОКС-БД – серые столбцы справа).

Доза по ДОКС 5 мг/кг

Из рисунка 1 видно, что после введения ДОКС в составе ФХ-ДОКС-ФД и ФХ-ДОКС-БД через 3 часа наблюдается более низкое его содержание в крови по сравнению с контролем ( $0,1 \leq P \leq 0,05$  для ФХ-ДОКС-ФД,  $0,05 \leq P \leq 0,02$  для ФХ-ДОКС-БД). Это может свидетельствовать о более быстрой абсорбции ДОКС, снабжённого транспортной системой с адресным фрагментом, органами и тканями организма. Некоторое превышение над контролем содержания ДОКС в крови через 6 и 24 часа для ФХ-ДОКС-ФД указывает на более длительную циркуляцию в кровотоке ДОКС, введённого в составе ФХ-ДОКС-ФД. Однако следует отметить, что достоверность отличий в сравнении с контролем невелика и наблюдаемые различия позволяют говорить лишь о тенденции.

Из рисунка 2 (слева) видно, что через 3 часа в группе экспериментальных животных, которым внутривенно был введён ФХ-ДОКС-ФД, уровень ДОКС в опухолевой ткани почти в 2 раза выше, чем у животных контрольной группы ( $0,01 \leq P \leq 0,05$ ). Через 6 часов в этой группе животных превышение уровня ДОКС сохраняется, а через 24 часа различия исчезают.

Также из рисунка 2 (справа) видно, что различия в содержании ДОКС через 3 часа после введения его в свободном виде и в составе композиции

ФХ-ДОКС-БД недостоверны. Некоторое превышение над контролем содержания ДОКС в опухоли при его введении в составе ФХ-ДОКС-БД сохраняется через 6 и 24 часа. Это, вероятно, связано с меньшей скоростью элиминации ДОКС, введённого в кровоток в виде ФХ-ДОКС-БД.

Таким образом, накопление ДОКС в опухолевой ткани при его введении в составе коллоидных наночастиц с адресными конъюгатами выше, чем при введении ДОКС в свободном виде. При этом через 3 часа для ДОКС в составе наночастиц с адресным фрагментом фолиевая кислота-додециламин накопление в опухоли почти в 2 раза выше ( $0,01 \leq P \leq 0,05$ ) и в 1,4 раза выше ( $0,2 \leq P \leq 0,1$ ) после его введения в составе наночастиц с адресным фрагментом биотин-додециламин. Наблюдаемые различия между накоплением ДОКС в составе наночастиц, вектором в которых является фолиевая кислота, могут быть связаны с большей экспрессией соответствующих рецепторов и большим к ним сродством [5].

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

### ***Список литературы***

1. Cerqueira B.B., Lasham A., Shelling A.N., Al-Kassas R. Nanoparticle therapeutics: Technologies and methods for overcoming cancer // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2015. – 97 (Pt A). – P. 140–151.
2. Watkins R., Wu L., Zhang C., Davis R.M., Xu B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues // International Journal of Nanomedicine. – 2015. – №10. – P. 6055–6074.
3. Наносистема на основе растительных фосфолипидов для включения биологически активных соединений и способ её получения. Патент РФ №2009104784/15 №2391966, 13.02.2009 / А.И. Арчаков, М.К. Гусева, В.Ф. Учайкин, О.М. Ипатова, Е.Г. Тихонова, Н.В. Медведева, А.В. Лисица, В.Н. Прозоровский, О.С. Стрекалова, А.В. Широнин // Патент России №2391966. – 2010.
4. Бюл. №17.

5. Санжаков М.А. Синтез адресного конъюгата для фосфолипидной системы транспорта лекарств / М.А. Санжаков [и др.] // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60 (6). – С. 713–716.

6. Jones G., McTavish K., McEwan J., Rice J., Nowotnik D. Vitamin-mediated targeting as a potential mechanism to increase drug uptake by tumours // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2004. – №98 (10). – Р. 1625–1633.