



¹ Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр „Фундаментальные основы биотехнологии“ Российской академии наук»
² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Малотоксичные микросферы для направленной доставки доксорубицина

Е.В. Филатова¹, А.П. Бонарцев^{1, 2}, Г.А. Бонарцева¹

Адрес для переписки: Елена Викторовна Филатова, 7887elena@mail.ru

Получены микросферы для направленной доставки доксорубицина на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ). Изучена кинетика высвобождения доксорубицина из микросфер. Как показывают полученные данные, лекарственное вещество высвобождается в основном по деструктивному механизму. Диффузионный механизм выражен слабо из-за сильного гидрофобного взаимодействия между полимерной матрицей и молекулами доксорубицина. Берст-эффект (взрывной эффект первоначального выброса) практически отсутствовал. Пролонгированное высвобождение доксорубицина может быть использовано при длительной химиотерапии. Пролонгированный эффект высвобождения доксорубицина из полимерной матрицы микросфер наблюдался в течение 120 дней. Новое поколение высококачественных микросфер может служить основой для направленной доставки доксорубицина, используемого в терапии ряда онкологических заболеваний. Малотоксичные биосовместимые микросферы на основе ПОБ с включением доксорубицина позволят уменьшить дозу цитостатика и повысить его эффективность, что откроет перспективу для использования этих микросфер при длительной химиотерапии.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират, пролонгированное высвобождение, биосовместимость, биodeградация

Введение

В эпоху развития персонализированной медицины необходимо создавать индивидуальные фармацевтические препараты, учитывающие метаболические особенности конкретного пациента. Для создания лекарственных форм нового поколения важно изучать возможности депонирования лекарственного вещества (ЛВ) в организме и особенности его пролонгированного высвобождения. Сказанное в боль-

шей степени касается лекарственных средств химиотерапевтической направленности.

Доксорубин – противоопухолевый препарат широкого спектра действия. К наиболее опасным побочным эффектам этого препарата, ограничивающим его дозу, относятся кардиотоксичность и миелосупрессия. Разработанная нами новая технология контролируемого высвобождения препарата может стать основой для создания малотравматичных

интраартериальных методик лечения рака печени. Микросферы, содержащие доксорубин, предполагается вводить в питающую опухоль артерию, где микросферы будут обеспечивать эмболизацию и контролируемую доставку препарата. При этом диаметр вводимых микросфер должен соответствовать диаметру сосуда.

Преимущество микросферной химиоэмболизации перед масляной заключается в том, что микросферы способны удерживать химиопрепарат в опухоли более продолжительный период времени, что повышает эффективность лечения. При этом токсическое воздействие цитостатика на организм уменьшается. Кроме того, появляется возможность изменять концентрацию химиопрепарата в зависимости от вида опухоли.

Таким образом, использование предложенной нами технологии доставки доксорубицина, исключаяющей его системное воздействие на организм, позволит улучшить качество жизни пациентов.

Доксорубин – антибиотик антрациклинового ряда, выделенный из культуры *Streptomyces peuceticus var. caesi*. Молекулярная масса 579,99 Да. Красный кристаллический порошок или пористая масса. Умеренно растворим в воде, нерастворим в спирте. Нестабилен в растворах с pH менее 3 и более 7. На рис. 1 приведена структурная формула доксорубина. Брутто-формула $C_{27}H_{29}NO_{11}$.



Цель

Целью данной работы было получение, а также изучение микросфер на основе ПОБ для направленной доставки доксорубина. Перед нами стояли задачи получить биополимерные микросферы на основе поли-3-оксибутирата, содержащие доксорубин, изучить морфологию микросфер с помощью электронной сканирующей и световой микроскопии, а также кинетику высвобождения доксорубина из микросфер.

Материал и методы

Для получения микросфер из ПОБ с инкапсулированным ЛВ применяли метод одноэтапного эмульгирования [1]. Доксорубин и ПОБ (молекулярная масса от 220 до 280 кДа) в соотношении 1:4 растворили в хлороформе (4 мл) и постепенно добавляли к 250 мл 1,2%-ного водного раствора поливинилового спирта (ПВС). Полученный раствор в течение двух часов перемешивали с помощью механической верхнеприводной мешалки RZR 2021 (Heidolph, Германия) при скорости 600–2000 об/мин. После полного испарения органического растворителя более однородные по размеру фракции микросфер фильтровали через текстильные фильтры. Затем микросферы отделяли от ПВС центрифугированием в течение шести минут при скорости 4400 об/мин на центрифуге 5702 R (Eppendorf, Германия). Далее трижды промывали водой для полного удаления эмульгатора и ЛВ на поверхности сфер. После этого микросферы сушили в термостате при температуре 37 °С и полученный порошок растирали в ступке. Процент ЛВ в микросферах определяли спектрофотометрически (по максимумам поглощения – 253 и 290 нм) для доксорубина при сравнении с контрольным раствором ПОБ и ЛВ в хлороформе. Средний диаметр и стандартное отклонение полученных партий микросфер определяли по микрофотографиям.

Контролируемое высвобождение доксорубина из микросфер проводили при температуре 37 °С в термостате ТС-1/20 (Россия) в 4 мл 0,025 М калий-фосфатного буфера (рН=7,4) с не-

большим добавлением эмульгатора (0,05% Triton X-100 по объему) при перемешивании в пробирках на шейкере со скоростью 300 об/мин. При исследовании кинетики высвобождения доксорубина через заданные интервалы времени (через один-два часа в течение первых суток, потом через один-два суток) микросферы отделяли от буфера центрифугированием на центрифуге 5702 R (Eppendorf, Германия) при скорости 14 000 об/мин и добавляли 4 мл свежего буфера. Содержание ЛВ в опытном растворе определяли спектрофотометрически (контроль 0,025 М калий-фосфатный буфер, рН=7,2). Остаточное содержание доксорубина в микросферах оценивали, растворяя их в заданном количестве растворителя, с последующим определением концентрации доксорубина в растворе спектрофотометрически (253 и 290 нм) и сравнением с контрольными растворами известной концентрации доксорубина.

Результаты и обсуждение

Были получены микросферы с массовой долей доксорубина в полимере $9,7 \pm 3,1\%$. Средний диаметр составил $40,6 \pm 10,0$ мкм. На рисунке 2 отображены микросферы, полученные с помощью световой микроскопии.

Для выявления более полной картины строения микросфер с включением доксорубина был сделан ряд микрофотографий с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 3). Как видно, морфология микросфер различна. Одни микросферы имеют мелкодисперсную структуру, другие – более крупную структуру. Иногда при формировании микросфер мелкая микросфера поглощается более крупной. В результате получают двойные микросферы. Нередко микросферы образуют скопления: на крупных микросферах образуются мелкие, причем более мелкие вписываются в ячейки более крупной.

При изучении высвобождения доксорубина из микросфер применяли метод контроль-релиза. Профиль высвобождения доксорубина из микросфер представлен на рис. 4. Высвобождение носило долговременный пролонгированный харак-

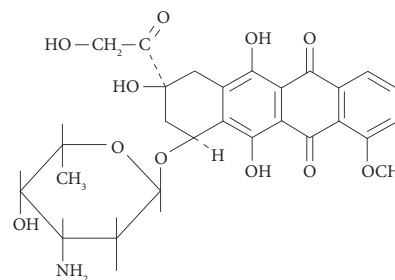


Рис. 1. Структурная формула доксорубина

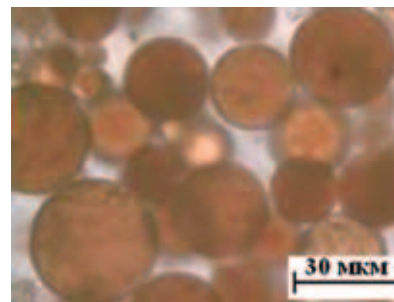


Рис. 2. Световая микроскопия: биополимерные микросферы с инкапсулированным доксорубином на основе ПОБ

тер. Это свойство кинетики доксорубина может быть использовано при разработке малотоксичной длительной химиотерапии. Отсутствие берст-эффекта позволяет избежать влияния первоначального выброса и кардинально снизить токсическое действие на организм. Кроме того, химиотоксичность значительно снижается из-за отсутствия системного воздействия доксорубина на организм. Это позволит значительно улучшить состояние больного во время лечения и повысить качество его жизни. Таким образом, полученные результаты служат основанием для разработки малотоксичных химиотерапевтических форм доксорубина длительного действия.

Согласно данным литературы, в настоящее время активно разрабатываются малотоксичные формы доксорубина. Уже разработаны термолипосомы с включением доксорубина [2]. Однако они подвержены очень быстрому разрушению и требуют специальных условий хранения и транспортировки. Микросферы с включением доксорубина на основе ПОБ лишены этих недостатков.

Онкология

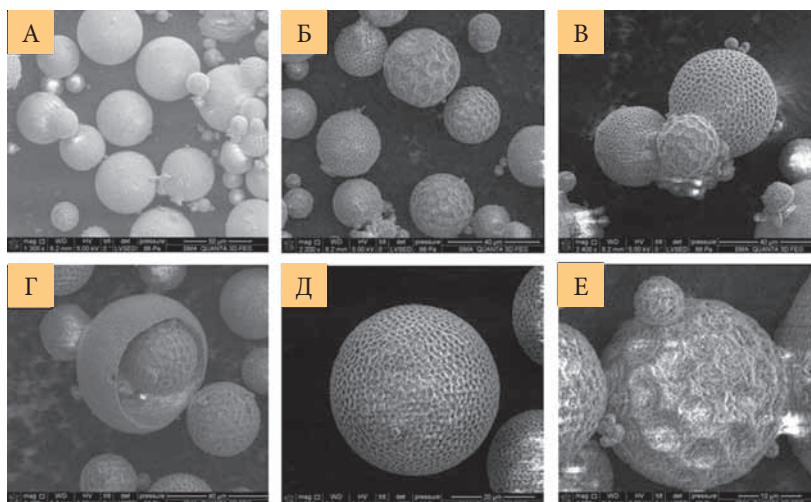


Рис. 3. Биополимерные микросферы с инкапсулированным доксорубицином на основе ПОБ: средний размер микросфер $40,6 \pm 10,0$ мкм, массовая доля включенного ЛВ $9,7 \pm 3,1\%$ (сканирующая электронная микроскопия: А – 1300-кратное увеличение, Б – 22000-кратное, В – 2400-кратное, Г – 2429-кратное, Д – 4000-кратное, Е – 6000-кратное)

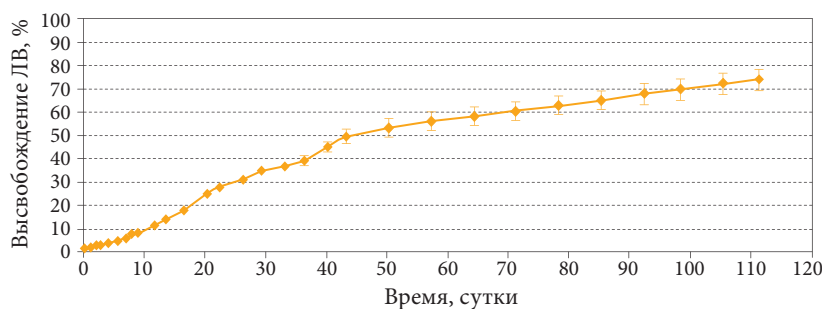


Рис. 4. Кинетика высвобождения доксорубицина из микросфер на основе ПОБ (0,025 М фосфатный буфер рН = 7,4, температура 37 °С): средний размер микросфер $40,6 \pm 10,0$ мкм, массовая доля включенного ЛВ $9,7 \pm 3,1\%$

Как известно, высвобождение ЛВ из биоразлагаемых микросфер предполагает три стадии: первая – взрывной эффект – высвобождение с высокой скоростью, вторая – относительно медленное равномерное высвобождение, третья – быстрое высвобождение, приводящее к полному выходу ЛВ из полимерных микросфер [3]. Известны два основных механизма высвобождения ЛВ из биополимерных систем: диффузия и деградация. Диффузия осуществляется через поры полимера, а также между цепями полимера. Первая стадия высвобождения (взрывной эффект) реализуется за счет диффузионного механизма [3], вторая – за счет двух механизмов, находящихся в равновесии: диффузии и деградации полимера, при которой уменьшается

его молекулярная масса и, как следствие, повышается мобильность диффундирующего через полимер ЛВ. Деградация большинства биоразлагаемых полимеров осуществляется за счет гидролиза в объеме полимера и неспецифической ферментативной биодеструкции. На поздних этапах высвобождения деградация играет решающую роль, поскольку высвобождение ЛВ с относительно равномерной скоростью из биополимерной системы происходит благодаря деградации. Третья стадия высвобождения связана с быстрой деградацией полимера, утратившего механическую стабильность, и выходом оставшегося ЛВ [4–6]. Между тем, изучая кинетику высвобождения доксорубицина, мы обнаружили, что первой стадии

высвобождения (взрывного эффекта) нет. То есть диффузионный процесс выражен очень слабо. Почему? Возможно, из-за высокой молекулярной массы ЛВ (молекулярная масса доксорубицина 579,99 Да). Практически полное отсутствие берст-эффекта может быть обусловлено также структурной формулой доксорубицина, а именно наличием большой неполярной четырехциклической группировки. Вероятно, эта группировка за счет сильного гидрофобного взаимодействия с цепями полиоксипропиридата тормозит процесс диффузии. Кроме того, гидроксильные группы в составе доксорубицина взаимодействуют с карбонильными и гидроксильными группами полиоксипропиридата, образуя сильные водородные связи, что еще больше замедляет процесс диффузии. Высвобождение доксорубицина происходит линейно.

Морфологию деструкции микросфер изучали в процессе длительного высвобождения доксорубицина (120 суток). На рисунке 5 показаны три степени биодеструкции микросфер.

На первой стадии наблюдается только начало деструкции. Поверхность сферы постепенно разрушается, и от нее отделяются полимерные нити. На второй стадии микросфера распадается на сегменты и полимерная масса выходит в окружающую среду. Третья стадия характеризуется полным распадом структуры полимерной матрицы.

Заключение

Получены малотоксичные микросферы на основе биосовместимого и биоразлагаемого полимера поли-3-оксипропиридата с включением доксорубицина. Изучены морфология строения микросфер и кинетика пролонгированного высвобождения доксорубицина. За счет сильных гидрофобных связей между полимерной матрицей и молекулами доксорубицина высвобождение происходит в основном по деструкционному механизму, в то время как диффузионный механизм выражен очень слабо. Берст-эффект (взрывной эффект первоначального выброса) [3] практически не наблюдается. На основе



анализа кинетики высвобождения доксорубина *in vitro* выявлены принципиальные преимущества полученных пролонгированных лекарственных форм доксорубина от традиционных лекарственных форм. В отличие от традиционных форм высвобождение доксорубина из полимерной матрицы не вызывает резкого выброса ЛВ.

Таким образом, кинетический профиль высвобождения ЛВ из микро-сфер в наших экспериментах позволяет говорить о создании новых малотоксичных микросфер для направленной доставки доксорубина. В то же время по сравнению с другими биосовместимыми полимерами, такими как полилактиды и полигликолиды, ПОБ характеризуется более высокой гидролитической устойчивостью. Не случай-



Рис. 5. Биодegradация микросфер с инкапсулированным доксорубином в 0,025 М фосфатном буфере (рН = 7,4, температура 37 °С): средний размер микросфер $40,6 \pm 10,0$ мкм, массовая доля включенного ЛВ $9,7 \pm 3,1\%$ (А – 10 суток, В – 60 суток, С – 120 суток)

но завершающий этап разрушения биополимерной структуры отсутствует, резкого выброса ЛВ из микросфер не наблюдается [7]. Использование ПОБ позволяет создавать новые малотоксичные микросферы для направленной доставки

доксорубина. По сравнению с традиционной химиотерапией разработанные нами микросферные системы направленной доставки доксорубина на основе ПОБ помогут снизить местную токсичность и избежать системной токсичности. ☺

Литература

1. Лившиц В.А. Системы контролируемого высвобождения биологически активных соединений на основе поли-3-гидроксибутирата: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М., 2009.
2. Тазина Е.В., Мецерикина В.В., Игнатъева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина // Российский биотерапевтический журнал. 2009. Т. 8. № 1. С. 40–47.
3. Brannon-Peppas L. Polymers in controlled drug delivery // Med. Plast. Biomater. 1997.
4. Wada R., Hyon S.H., Ikada Y. Kinetics of diffusion-mediated drug release enhanced by matrix degradation // J. Control Release. 1995. Vol. 37. P. 151–160.
5. Husmann M., Schenderlein S., Lück M. et al. Polymer erosion in PLGA microparticles produced by phase separation method // Int. J. Pharm. 2002. Vol. 242. № 1–2. P. 277–280.
6. Faisant N., Akiki J., Siepmann F. et al. Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: experiment and theory // Int. J. Pharm. 2006. Vol. 314. № 2. P. 189–197.
7. Kosenko R.Y., Pankova Y.N., Iordanskii A.L., Zaikov G.E. Controlled release of the antiseptic from poly(3-hydroxybutyrate) films. Combination of diffusion and zero order kinetics // J. Balkan Tribological Association. 2008. Vol. 13. № 2. P. 139–146.

Low-Toxic Microspheres for Targeted Delivery of the Doxorubicin Drug

Ye.V. Filatova¹, A.P. Bonartsev^{1,2}, G.A. Bonartseva¹

¹ Federal State Institution 'Federal Research Centre 'Fundamentals of Biotechnology' of the Russian Academy of Sciences'

² Lomonosov Moscow State University

Contact person: Yelena Viktorovna Filatova, 7887elena@mail.ru

Microspheres based on poly-3-oxybutyrate (POB) for a targeted delivery of the Doxorubicin drug were obtained. The kinetics of the Doxorubicin drug release from the microspheres were studied. Data on the kinetics of the Doxorubicin release suggests that the drug release mainly by the degradation mechanism. The diffusion mechanism is very weakly expressed due to the strong hydrophobic interactions between the polymer matrix and the Doxorubicin molecules. The burst effect, that is the explosive effect of the initial release, was practically not observed. The sustained release of the Doxorubicin drug can be used for a prolonged chemotherapy. The action of sustained release of the Doxorubicin from the polymer matrix was observed during 120 days. A new generation of high-quality microspheres have a basis for the targeted delivery of the Doxorubicin drug which is used in the therapy of many oncological diseases. The low-toxic biocompatible POB-based microspheres with inclusion of the Doxorubicin will reduce the cytostatic dosage as well as increase the drug action efficiency.

Key words: poly-3-oxybutyrate, sustained release, biocompatibility, biodegradation

Онкология