

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ПРЕПАРАТОВ ПРОИЗВОДНЫХ НИТРОЗОАЛКИЛМОЧЕВИНЫ

А.В. Ланцова, Н.А. Оборотова, Н.М. Перетолчина, А.П. Полозкова, З.С. Шпрах, И.Б. Шоуа, А.Ю. Барышников

*ГУ Российский онкологический научный центр им. КН. Блохина РАМН,
г. Москва*

Лизомустин - оригинальный отечественный противоопухолевый препарат, хлорэтильное производное нитрозомочевина на основе L-гомоцитруллина, относится к группе нитрозоалкилмочевин (НАМ). БХНМ - 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина- воспроизведенная субстанция Кармустина (BiCNU). Препарат относится также к классу НАМ. Созданы пегилированные липосомы лизомустина и БХНМ, в составы которых включили ПЭГ-5000 или ПЭГ-2000-липиды. Противоопухолевая активность новых лекарственных форм изучена на модели экспериментальной опухоли мышей: лимфобластном лейкозе L-1210. Показано, что лизомустин в ПЭГ-5000 - липосомальной лекарственной форме (ЛЛФ-5000) - в дозах от 125 до 250 мг/кг проявил максимальный противоопухолевый эффект в отношении лейкоза L-1210, при этом излечение животных составило 100 %, в то время как в ПЭГ-2000 - липосомальной лекарственной форме (ЛЛФ-2000) - 100 % эффект получен лишь в дозе 175 мг/кг. БХНМ в ЛЛФ-5000 в дозах 40 и 45 мг/кг проявил максимальный терапевтический эффект, при этом излечение животных составило 100 %. Доза 50 мг/кг вызвала 100 % гибель животных из-за токсичности. При применении БХНМ в ЛЛФ-2000 форме 100% излечения не выявлено.

COMPARATIVE INVESTIGATION OF ANTITUMOR ACTIVITY OF LIPOSOMAL DOSAGE FORMS OF NITROSOALKYLUREA DERIVATIVES A.V. Lantsova, N.A. Oborotova, N.M. Peretolchina, A.P. Polozkova, Z.S Shprakh, I.B Showa, A.Yu Baryshnikov

Russian N.N. Blokhin memorial cancer research center RAMS, Moscow

Lysomustine is an original antitumor preparation, chloroethyl derivative of nitrosourea on L-homocitrulline basis. BCNU is 1,3-bis (2-chloroethyl)-1 -nitrosourea, Carmustine (BiCNU) generic substance. PEG- liposomes of Lysomustine and BCNU with PEG-5000 (LEF-5000) and PEG-2000 (LEF-2000) in lipid membranes have been obtained. The antitumor efficiency of new pharmaceutical formulations was investigated on experimental tumor model - lymphoblastic leucosis L-1210. Lysomustine in LEF-5000 on lymphoblastic leucosis L-1210 had shown optimal therapeutic effect at doses from 125 to 250 mg/kg resulting in 100 % recovery of treated animals, while LEF-2000 showed 100 % antitumor effect only at a dose of 175 mg/kg. BCNU in LEF-5000 had shown maximal therapeutic effect at doses 40 and 45 mg/kg (100 % recover of animals) Dose of 50 mg/kg caused 100 % animals death due to toxicity. No 100 % recovery was revealed using BCNU in LEF-2000.

Введение

Лизомустин - 2-хлорэтилнитрозоуреидопроизводное аминокислоты лизин - относится к группе нитрозоалкилмочевин (НАМ) и представляет собой смесь двух изомеров (активного и малоактивного). Препарат синтезирован в Институте органического синтеза Уральского отделения РАН, лиофилизированная лекарственная форма для внутривенного введения разработана в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Клиническое изучение лизомустина показало эффективность препарата при мелкоклеточном раке легкого и меланоме кожи [1].

БХНМ -1,3 -бис(2-хлорэтил)-1 - нитрозомочевина — воспроизведенная субстанция Кармустина (BiCNU). Препарат синтезирован в лаборатории антиметаболитов Института химии Уральского отделения РАН. В ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина разработана лекарственная форма данного препарата. Препарат относится к классу НАМ. В экспериментальных исследованиях высоко эффективен при опухолях мозга [3].

С целью увеличения селективности и пролонгирования противоопухолевого эффекта лизомустина и БХНМ нами предпринята попытка создания новой лекарственной формы препарата в виде липосом. Липосомы - липидные везикулы, обладающие рядом достоинств. Благодаря своим коллоидным свойствам, контролируемым размерам, поверхнос-

тным характеристикам, мембранотропности и биосовместимости липосомы рассматриваются как перспективные системы доставки препаратов в кровеносное русло. Универсальность свойств липосомального носителя обеспечивает широкие возможности его применения, особенно в химиотерапии рака, так как липосомы позволяют предотвратить быструю деградацию высокореактивных противоопухолевых препаратов в биологических субстратах организма [2].

Наряду с разработкой обычных липосом ("conventional"), в последние годы внимание ученых привлекают различные способы модификации поверхности липидных везикул с целью замедления захвата их клетками ретикулоэндотелиальной системы и пролонгирования времени циркуляции в кровотоке [4]. Известен способ видоизменения липосомальной поверхности полимерами с гибкой гидрофильной цепью. Для этого использовали синтетические липиды, конъюгированные с полиэтиленгликолем (ПЭГ). Включенные в липидный бислой молекулы ПЭГ способны создавать на мембране избыточное осмотическое давление, защищая тем самым липосомальные везикулы от опсоинов. Подобное покрытие позволяет липосомам дольше находиться в кровотоке, что повышает их противоопухолевую активность [5].

Цель настоящего исследования—изучить противоопухолевую активность липосомальных лекарственных форм Лизомустина и Бис(хлорэтил)нитрозомочевина в зависимости от их состава.

Материалы и методы

Лизомустин-ФСП 42-0494-4519-03, ООО«АКА-ДЕМФАРМ».

Лизомустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций - ФСП 42-0105-0867-01, ООО ФИРМА «ГЛЕС».

БХНМ - 1,3-бис(2-хлорэтил)-1- нитрозомочевина - воспроизведенная субстанция Кармустина (BiCNU).

При проведении исследований использованы вспомогательные вещества, которые отвечали требованиям соответствующей нормативной документации: ГФ XI изданий, USP 24 NF 19, отдельных фармакопейных статей и ГОСТов.

1. Лецитин (Фосфотидилхолин) - Е-80 «Lipoid» (Германия).
2. Холестерин - «Lipoid» (Германия).
3. Кардиолипин - «Lipoid» (Германия).

4. Фосфотидилэтаноламинполиэтиленгликоль - 2000 «Lipoid» (Германия).

5. Дистеароилфосфотидилэтаноламинполиэтиленгликоль — 5000 — «Avanti Polar Lipids» (США).

6. Спирт этиловый 95 % - ФС 42-3072-00.

7. Антиоксидант- а-токоферол USP-NF (24).

8. Раствор глюкозы 5 % для инъекций.

9. Вода дистиллированная для инъекций, ФС 42-2620-98.

Упаковочный материал

Для упаковки липосомальных дисперсий использовали флаконы из дрота (стекло НС-1) вместимостью 20 мл (ТУ 64-2-10-87), которые укупоривали силиконизированными резиновыми пробками по ИСО 8362-2 под обкатку алюминиевыми колпачками по ОСТ 64-009-86.

Приборы и аппаратура

В работе использовали вакуумный насос ВН-464А, испаритель ротационный ИР-1М, оборудование фирм «Миллипор» и «Nuclepore», прибор «Наносайзер» (Submicron Particle Sizer Nicomp 380, измеряющий размер наночастиц, США), мини-экструдер («Avanti Mini-Extruder» set № 610000, США).

1. Технологический метод получения пегилированных липосом Лизомустина

Малые однослойные пегилированные липосомы лизомустина получали гидратацией липидной пленки, образующейся после упаривания в вакууме спиртовых растворов липидов, 1% водным раствором субстанции лизомустина с последующей экструзией липосомальной дисперсии через поликарбонатные мембраны с уменьшающимся диаметром пор (1,2 мкм; 0,4 мкм; 0,2 мкм). В качестве липидной основы использовали лецитин (фосфотидилхолин), для стабилизации липидного бислоя и уменьшения "вытекания" включенного в липосомы препарата в липидную оболочку вводили холестерин и кардиолипин. Антиоксидант а-токоферол использовали для предотвращения перекисного окисления липидов. Для создания липосом с пролонгированным временем циркуляции в кровяном русле в составы липидных оболочек включали PEG 5000 DSPE и PEG 2000 PE.

2. Технологический метод получения пегилированных липосом БХНМ

Малые однослойные пегилированные липосомы БХНМ получали методом "обращения фаз". Субстанцию БХНМ вносили в хлороформную смесь липидов непосредственно перед первым вакуумным упариванием. Для создания липосом с пролонгированным временем циркуляции в кровяном русле в модельные смеси липидов включали PEG 5000 DSPE или PEG 2000 PE. Затем липидную пленку с дисперсией многослойных липосом БХНМ смывали эфиром и проводили повторное упаривание эфирной смеси под вакуумом. После водной регидратации липидной пленки липосомальную дисперсию пропускали через гомогенизатор, продавливая через поликарбонатные мембраны с уменьшающимся диаметром пор (1,2 мкм; 0,4 мкм; 0,2 мкм).

3. Определение размера липосом

Размер липосом определяли на спектрометре Nano-Sizer. Принцип работы прибора: определяется отраженный свет (под фиксированным углом) от совокупности частиц, суспендированных в водном растворителе. Интенсивность этого света колеблется во времени благодаря диффузии частиц. Существует четко определяемое характеристическое время жизни этих колебаний, которое обратно пропорционально диффузивности частиц. Далее просчитывается автокорреляционная функция флуктуирующей интенсивности и строится убывающая экспоненциальная кривая (зависимость от времени). После получения константы времени затухания τ , рассчитывается диффузивность частиц. Наконец, с помощью уравнения Стокса-Энштейна рассчитывается радиус частиц:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R},$$

где k - константа Больцмана ($1,38 \times 10^{-23}$ Дж/град^К),
 T - температура ($K = C^{\circ} + 273$),

η - вязкость раствора ($1,002 \cdot 10^{-2}$ для воды при 20°C).

Все математические операции проводили на компьютере с помощью специальной программы. На экране автокорреляционного спектрометра наблюдали кривую распределения липосом по размерам частиц. Результат оценивали с помощью гауссовского анализа (обработка полученных данных методом наименьших квадратов - анализ по

двум параметрам). Гауссовы популяции имели четко определяемый средний диаметр частиц. Однако этот подход используют только для простых распределений: симметричных унимодальных популяций. Асимметричные унимодальные и бимодальные распределения невозможно интерпретировать с помощью гауссовского анализа. Единственным признаком наличия более сложного распределения является высокое и растущее значение квадратичного отклонения (A^2). Эти распределения оценивают с помощью некомповского анализа. Nicomp-анализ дает в результате 3 или 4 параметра, по которым можно судить о распределении липосом в образце (%).

4. Биологический метод

Определение противоопухолевой активности новых липосомальных лекарственных форм Лизомустина и БХНМ проводили на экспериментальной модели опухоли мышей - лейкозе L-1210, мышах-гибридах BDF1, самцах.

Лейкоз прививали внутрибрюшинно по $1,0 \cdot 10^6$ клеток/мышь в 0,3 мл среды 199. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли. Препараты вводили внутрибрюшинно, однократно. Лизомустин в липосомальной лекарственной форме с PEG 5000 (состав 1) и с PEG 2000 (состав 2) (концентрация 10 мг/мл) вводили животным в дозах 100, 125, 150, 175, 200, 225 и 250 мг/кг. БХНМ в липосомальной лекарственной форме с PEG 5000 (состав 1) и с PEG 2000 (состав 2) (концентрация 2 мг/мл) - в дозах 30, 35, 40, 45 и 50 мг/кг.

Терапевтический эффект оценивали по двум критериям: увеличению продолжительности жизни леченых животных (УПЖ, %) и излечению животных.

1. УПЖ вычисляли по формуле:

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_k}{\text{СПЖ}_k} \times 100\%,$$

где СПЖ_0 и СПЖ_k - продолжительность жизни испытуемых мышей в опытных и контрольных группах, соответственно.

2. Излечение животных: n/p , где n/p - число излеченных мышей к общему числу животных в группе. Излеченными считали животных, не имеющих рецидивов заболевания после окончания лечения в течение 2 мес и более.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по критериям Стьюдента (параметрический) и Колмогорова - Смирнова (непараметрический).

Результаты и обсуждение

Получено два состава липосом с различными ПЭГ липидами. В результате разработки липосомальных лекарственных форм состава-1 Лизомустина и БХНМ в липидную мембрану включили PEG 5000 В8РЕ (ЛЛФ-5000), авсссгав-2-РШ2000РЕ (ЛЛФ-20(Ю)).

Лизомустин - водорастворимый препарат, это позволило включить его во внутреннее водное пространство липосом. БХНМ хорошо растворим в органических растворителях, и поэтому был включен в липидный бислой.

В результате проведенных технологических исследований установлено оптимальное молярное соотношение компонентов, включенных в модельные составы липосомального лизомустина и БХНМ.

Состав-1 (ЛЛФ-5000)

для лизомустина:	для БХНМ:
Лизомустин	БХНМ
Лецитин	Лецитин
Холестерин	Холестерин
Кардиолипин	Кардиолипин
Диете ароилфосфотидилэтаноламин	
Дистеароилфосфотидилэтаноламин	
полиэтиленгликоль 5000	полиэтиленгликоль 5000
а-токоферол	а-токоферол

Состав-2 (ЛЛФ-2000)

для лизомустина:	для БХНМ:
Лизомустин	БХНМ
Лецитин	Лецитин
Холестерин	Холестерин
Кардиолипин	
Кардиолипин	
Фосфотидилэтаноламин	Фосфотидилэтаноламин
полиэтиленгликоль 2000	полиэтиленгликоль 2000
а-токоферол	а-токоферол

Первичную стандартизацию липосомальших дисперсий проводили по следующим критериям качества: внешний вид, размер липидных везикул и противоопухолевая активность. Дисперсии липосом лизомустина и БХНМ по внешнему виду не различались - молочно-белые эмульсии, однородные, без расслоения.

При введении лизомустина в ЛЛФ-5000 сразу получены мелкие липосомы — 155 ± 23 нм, поэтому в дальнейшем данные липосомы не измельчали экстракционным методом. Для ЛЛФ-2000 лизомустина первоначальный размер липосом составил 980 ± 34 нм, после экструзии — 105 ± 30 нм. Размер липосом для БХНМ в ЛЛФ-5000 - 240 ± 28 нм, данные липосомы дополнительно не измельчали. Для БХНМ в ЛЛФ-2000 первоначальный размер составил 1535 ± 30 нм, после гомогенизации - 140 ± 21 нм, соответственно.

В табл. 1 представлены результаты изучения противоопухолевой активности ПЭГ липосом лизомус-

Как видно из табл. 1, лизомустин в ЛЛФ-5000 в

Т а б л и ц а 1
Противоопухолевая активность
липосомального лизомустина на лейкозе L-1210

Группа опыта	Доза, мг/кг, в/б x 1 раз	УТДЖ, % животных, погибших от лейкоза	Излечение животных, п/п. (%)
ЛЛФ-5000	100	357(1/5)	4/5(80)
липосомальная	125	—	6/6(100)
лекарственная	150	—	5/5(100)
форма	175	—	5/5(100)
лизомустина	200	—	5/5(100)
	225	—	5/5(100)
	250	—	5/5(100)
ЛЛФ-2000	100	178,5(2/5)	3/5(60)
липосомальная	125	385,5(2/5)	3/5(60)
лекарственная	150	386(1/5)	4/5(80)
форма	175	—	5/5(100)
лизомустина	200*	—	4/5(80)
	225**	614(1/5)	3/5(60)
	250**	—	3/5(60)

П р и м е ч а н и е: Контроль 1 - нелеченные мыши, средняя продолжительность жизни мышей 7,3 дня; контроль 2 - мышам вводили пустые липосомы, средняя продолжительность жизни 7 дней.

* В данных группах 20 % мышей пали от токсичности.

** В данной группе 40 % мышей пали от токсичности.

Данные статистически достоверны, $p < 0,05$ по отношению к контролю.

дозах от 125 до 250 мг/кг на мышцах с лейкозом L-1210 проявил самый высокий терапевтический эффект. В указанных дозах излечение мышей составило 100 %. Гибели животных от токсичности не выявлено. Лизомустин в ЛЛФ-2000 излечивал 100 % животных с лейкозом только в дозе 175 мг/кг. В дозах 100; 125 и 150 мг/кг излечение животных составляло 60, 60 и 80 %, соответственно. Дозы 200 и 225 мг/кг — токсичны для 20 %, доза 250 мг/кг - для 40 % мышей.

Данные табл. 2 показывают, что БХНМ в ЛЛФ-5000 и ЛЛФ-2000, примененный в дозах 30-35 мг/кг, проявлял смешанный эффект, выраженный как увеличением продолжительности жизни, так и излечением части животных. БХНМ в ЛЛФ-5000 в дозах 40 и 45 мг/кг проявил максимальный терапевтический эффект, при этом излечение животных составило 100 %. Доза 50 мг/кг оказалась летальной для 100 % мышей. При применении БХНМ в ЛЛФ-2000 форме 100% излечения не выявлено. Частичное излечение животных (17 %) наблюдали в дозах 40-45 мг/кг, в

дозе 50 мг/кг излечение животных увеличивалось до 33 %, однако оно сопровождалось гибелью 17 % мышей от токсичности.

Т а б л и ц а 2
Противоопухолевая активность липосомального БХНМ на лейкозе L-1210

Группа опыта	Доза, мг/кг, в/б x 1 раз	УГЖ, % животных, погибших от лейкоза	Излечение животных, n/n ₁ (%)
ЛЛФ-5000 липосомальная лекарственная форма БХНМ	30	160(6/6)	—
	35	111(3/5)	2/5(40)
	40	—	6/6(100)
	45	—	5/5(100)
50*	—	—	—
ЛЛФ-2000 липосомальная лекарственная форма БХНМ	30	104,9(5/6)	1/6(17)
	35	123,3(6/6)	—
	40	144(5/6)	1/6(17)
	45	166(5/6)	1/6(17)
	50**	124(3/6)	2/6(33)

Примечание: контроль 1 – нелеченные мыши, средняя продолжительность жизни мышей 8,6 дня; контроль 2 – мышам вводили пустые липосомы, средняя продолжительность жизни 8,2 дня.

*В данной группе 100 % мышей погибли от токсичности.

** В данной группе 17 % мышей погибли от токсичности.

Данные статистически достоверны, $p \leq 0,05$ по отношению к контролю.

Таким образом, проведенные исследования показали, что лизомустин и БХНМ в новой ЛЛФ-5000 оказались наиболее эффективными. Лизомустин, примененный в ЛЛФ-5000, позволяет расширить диапазон доз от 125 до 250 мг/кг, излечивающих 100 % животных без проявления токсичности. Как показала ранее проведенные исследования, лизомустин в

лиофилизированной лекарственной форме излечивал 100% животных с лейкозом L-1210 только в дозах 150 и 175 мг/кг. БХНМ в ЛЛФ-5000 показала большую эффективность по сравнению с ЛЛФ-2000 БХНМ (100 % излечение в дозах 40-45 мг/кг).

Выводы

1. Разработаны новые лекарственные формы Лизомустина и БХНМ в виде пегилированных липосом.
2. Показан высокий противоопухолевый эффект лизомустина в ЛЛФ-5000 липосомах во всех тестируемых дозах (125-250 мг/кг).
3. Лизомустин в ЛЛФ-5000 является более эффективной лекарственной формой, чем ЛЛФ-2000, и позволяет расширить диапазон терапевтических доз и снизить токсичность препарата.
4. БХНМ в ЛЛФ-5000 вызвала 100% излечение животных от лейкоза L-1210 в дозах 40 и 45 мг/кг.

Литература

1. Давыдов М.И., Барышников А.Ю. Экспериментальная онкология на рубеже веков. М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. С. 147-159.
2. Грегориадис Г., Аллисон Л. Липосомы в биологических системах. М: Медицина, 1983. 256 с.
3. Рышкова У.Е. Совершенствование методов стандартизации лиофильно высушенных лекарств на примере противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины: Дис. ... канд. физ.-мат. наук. М., 2000. С. 27-31.
4. Maguyama K., Yuda T., Okamoto A. et al Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphiphatic polyethylene glycol // Biochim. Biophys. Acta. 1992. Vol. 1128. P. 44-49.
5. Moghimi S.M., Patel H.M. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system, the concept of tissue specificity // Adv. Drug Del. Rev. 1998. Vol. 32, № 1/2. p. 45-48.

Поступила 5.04.05