



УДК 557.112.3.087:616.858-008.6+577.113.416

ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОСОМНОГО ПРЕПАРАТА

2,4-ДИ(1-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИБУТИЛ)ДЕЙТЕРОПОРФИРИНА-IX

© 1999 г. А. В. Решетников, И. В. Жигальцев, С. Н. Коломейчук, А. П. Каплун[#], В. И. Швец, О. С. Жукова*, А. В. Карменян*, А. В. Иванов*, Г. В. Пономарев**

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, 117571, Москва, пр. Вернадского, 86;

* Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва;

** Институт биомедицинской химии РАМН, Москва

Поступила в редакцию 02.12.98 г. Принята к печати 12.05.99 г.

Получен препарат порфиринового фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии рака в липосомной форме, за счет чего повышена эффективность действия этого фотосенсибилизатора *in vitro* в 2.5 раза. Изучен состав и некоторые свойства нового препарата. Реализован алгоритм комплексного подхода по прогнозированию эффективности фотосенсибилизаторов в модельных экспериментах *in vitro*. Подход основан на использовании двух моделей: оценки распределения в системе *n*-октанол/фосфатный буферный раствор с рН 7.4 и определения фотоцитотоксических свойств в культуре клеток аденокарциномы яичника СаОv.

Ключевые слова: липосомы; порфирины; фотодинамическая терапия; фотосенсибилизаторы.

В настоящее время тетрапиррольные соединения (например, порфирины и производные ряда хлорофилла) вызывают большой интерес с точки зрения терапии злокачественных новообразований. В течение последнего десятилетия сформировался соответствующий клинический подход, именуемый фотодинамической терапией опухолей (ФДТ), состоящий в последовательных операциях системного или местного введения соединения (фотосенсибилизатора, ФС) в организм и лазерного облучения опухоли на длине волны, соответствующей одному из максимумов поглощения ФС (как правило, длинноволновому). Проблема такого подхода – повышение селективности накопления ФС в опухоли [1], так как следствием низкой селективности является недостаточная эффективность лечения и повышенная чувствительность кожи к дневному свету.

С целью повышения этой селективности использовались разные подходы:

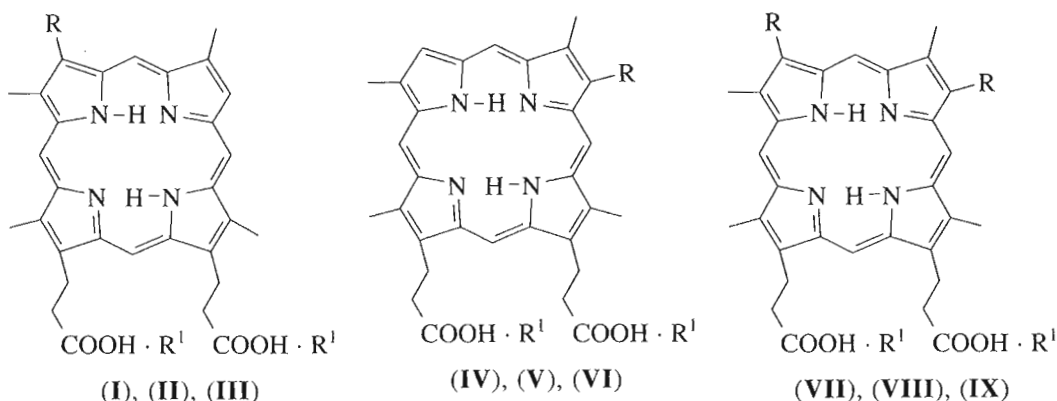
- 1) химическая модификация периферических заместителей ФС [2–5];
- 2) ковалентное присоединение ФС к моноклональным антителам против опухолеассоциированных антигенов [6, 7];
- 3) образование нековалентных комплексов ФС с липопротеинами [8];
- 4) использование ФС в виде липосомных препаратов [9, 10];
- 5) целевая доставка с помощью векторов, способных селективно связываться с клеточными органеллами раковых клеток [10, 11].

Перспективным подходом, позволяющим одновременно с повышением селективности решить проблему сольubilизации гидрофобных ФС, является получение препаратов ФС в липосомной форме.

Липосомы, как инструмент для изучения клеток и воздействия на их метаболизм, стали рассматривать в середине 70-х годов. Они использовались для введения различных веществ в клетки, а также как перспективные средства доставки различных лекарственных препаратов и биологически активных агентов *in vivo* [12–14]. В ходе многочисленных исследований было показано, что с помощью липосом можно значительно снизить токсичность и повысить эффективность дей-

Сокращения: БОЛ – большие однослойные липосомы; ДП – дейтеропорфирин-IX; K_p – коэффициент распределения; ЛП – липосомный препарат – здесь: смесь нагруженных липосом и несвязавшегося порфирина; ЛФ – липосомная форма – здесь: нагруженные липосомы, отделенные от несвязавшегося ФС; МЛЛ – мультислойные липосомы; МОЛ – малые однослойные липосомы; ФДТ – фотодинамическая терапия опухолей; ФС – фотосенсибилизатор; Chol – холестерин; ePC – яичный фосфатидилхолин; SDC – дезоксихолат натрия.

[#] Автор для переписки (e-mail: kapa3155@glasnet.ru; тел.: (095) 434-83-55).



(I), (IV), (VII) R = CH(Me)CHAc₂;
 (II), (V), (VIII) R = CH(Me)CH₂Ac;
 (III), (VI), (IX) R = CH(Me)CH₂CH(OH)Me;
 R¹ = *N*-метил-*D*-глюкозамин

Рис. 1. Полученные в работе ФС в водорастворимой форме, для которых был определен K_p .

ствия традиционно используемых лекарственных препаратов [15, 16]. Наиболее перспективные направления применения липосом в качестве потенциальных лекарственных форм – противоопухолевые, противогрибковые, бактерицидные и антивирусные препараты [13, 17, 18].

Выбор ФС, способного максимально эффективно включаться в липосомы, осуществлялся нами на основе предварительного определения коэффициента распределения (K_p) между *n*-октанолом и водой для приведенных на рис. 1 фотосенсибилизаторов порфириновой природы.

ФС были синтезированы согласно методикам, описанным ранее [19–21], в виде диметилловых эфиров и подвергнуты кислотному или щелочному гидролизу, после чего переведены в водорастворимые комплексы с *N*-метил-*D*-глюкозамин [22]. Методика определения K_p была заимствована нами из классической работы Д. Кесселя [23] и несколько видоизменена. В частности, 2-октанол был заменен на *n*-октанол в связи с большей доступностью для нас последнего. Растворимостью *n*-октанола в воде (0.02% при 20°C в отличие от нерастворимого в воде 2-октанола) было решено пренебречь. Полярной фазой служил 0.1 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4. Как известно [24], такой показатель pH характерен для внеклеточной среды, и использование данного буфера должно приблизить модель к реальному распределению ФС между межклеточным матриксом и плазматической мембраной.

Для сравнения были взяты такие известные ФС как “Димегин” (2,4-ди(α-метоксиэтил)дейтеропорфирин-IX) [25–28] и “Фотогем” (представляет собой сложную смесь моно- и олигомеров производных гематопорфирина-IX) [29–31], и

протопорфирин-IX в виде комплексов с *N*-метил-*D*-глюкозамин.

Соединения, одинаково легко растворяющиеся как в полярной, так и в неполярной фазах (для них $K_p \geq 1$) принято считать амфифильными [32]. Таковыми, как оказалось, являются все 9 исследованных ФС (таблица). Причем липофильность соединений варьировала в широких пределах (K_p 3.2–28.0). Коэффициент распределения ФС, взятых для сравнения, составил: 40 для “Димегина” и 1.5 для “Фотогема”.

Коэффициенты распределения *n*-октанол/0.1 М фосфатный буфер, pH 7.4, для полученных в работе порфириновых ФС*

Фотосенсибилизатор	K_p
“Фотогем”	1.5 ± 0.1
2-Оксо-ДП (II)	3.2 ± 1.3
Протопорфирин-IX	4.3 ± 0.7
2-Диоксо-ДП (I)	4.9 ± 0.6
4-Оксо-ДП (V)	9.1 ± 0.1
2,4-Диоксо-ДП (VIII)	10.0 ± 0.5
2,4-Дигидрокси-ДП (IX) (ФС IX)	17.0 ± 0.5
2,4-Тетраоксо-ДП (VII)	19.4 ± 0.9
2-Гидрокси-ДП (III)	20.7 ± 0.9
4-Диоксо-ДП (IV)	28.0 ± 2.0
4-Гидрокси-ДП (VI)	28.0 ± 0.2
“Димегин”	40.0 ± 3.8

* K_p определяли после достижения системой равновесия по поглощению ФС при 402 нм как соотношение концентраций ФС в водной и октанольной фазе. Димегин и Фотогем – препараты сравнения.

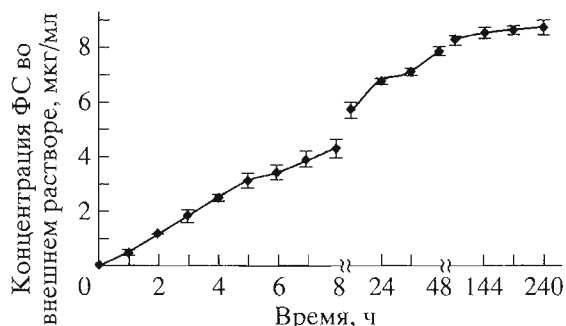


Рис. 2. Диализ 2,4-дигидрокси-ДП (ФС IX). Среда – 0.1 М фосфатный буфер с pH 7.4. Начальная концентрация ФС во внутреннем объеме 17.2 мкг/мл. В процессе диализа концентрация ФС во внешнем растворе измерялась спектрофотометрически с интервалом 1 ч (первые 8 ч), 8 ч (8–48 ч) и 48 ч (48–240 ч) при 20°C.

Известно [33, 34], что определение K_p помогает оценить эффективность включения соединения в липосомы (отношение количества вещества, включившегося в липосомы, к его общему количеству) и устойчивость полученной ЛФ. С этой точки зрения нас заинтересовал прежде всего 2,4-ди(1-метил-3-гидроксибутил)дейтеропорфирин-IX (IX). Он лучше большинства рассмотренных ФС растворяется в воде (данные не приведены). Следовательно, для него можно увеличить эффективность включения в липосомы за счет увеличения концентрации в водной фазе. При этом он имел достаточно высокий коэффициент распределения – 17.0. С другой стороны, ФС (IX) доступней монозамещенных 2- и/или 4-(1-метил-3-гидроксибутил)дейтеропорфиринов-IX (III) и (VI), имеющих близкую к порфирину (IX) растворимость в воде и K_p , соответственно 20.7 и 28.0.

Выбор типа используемых липосом (МЛЛ, БОЛ или МОЛ) обычно осуществляется в зависимости от ожидаемого биологического эффекта. Тип липосом определяет степень включения вещества. Размер липосом влияет на их проникновение из кровотока в ткани (в том числе на скорость выведения из организма), на биораспределение и фармакологическое действие включенного в них вещества [35–37]. Поскольку выход растворенного вещества из внутреннего объема липосом ограничен проницаемостью липидного бислоя, МЛЛ, благодаря своей структуре, обладают наибольшей удерживающей способностью [37]. Для крупных липофильных молекул также лучше подходят МЛЛ, ввиду относительно большего содержания в них липидной фазы. МЛЛ вполне пригодны для тестов на клеточных культурах, но не могут быть использованы для экспериментов *in vivo*, так как из-за больших размеров, ввиду опасности жировой эмболии, их нельзя вводить в кровоток.

Все синтезированные нами ФС способны образовывать устойчивые водные растворы (1–10%).

Это позволило использовать для загрузки липосом способ, применяемый для полярных соединений. Все традиционные способы загрузки полярных соединений основаны на способности липосом захватывать определенный объем водной фазы (включая растворенные в ней вещества) в ходе их приготовления. При этом эффективность включения напрямую зависит от типа липосом: от 1% для МОЛ до почти 90% для МЛЛ. Невысокая эффективность загрузки МОЛ объясняется их небольшим внутренним объемом (0.2–0.8 мкл/ммоль липидов), в то время как внутренний объем БОЛ и МЛЛ достигает 30 мкл/ммоль липидов. Кроме того, препараты БОЛ и МЛЛ могут быть приготовлены с более высокой концентрацией липидов, чем МОЛ, что также способствует увеличению эффективности загрузки [14].

Итак, мы остановили свой выбор на МЛЛ, полагая, что избранный ФС (IX) (далее ФС IX), как крупная и весьма липофильная молекула, должен включаться в них лучше и удерживаться дольше, по сравнению с другими типами липосом. Кроме того, МЛЛ получать просто, что немаловажно для предварительных экспериментов. Для получения МЛЛ мы воспользовались наиболее простым приемом – механическим встряхиванием липидной пленки с водным раствором вещества [38].

Степень включения ФС IX в МЛЛ (отношение активное вещество/липиды) и эффективность включения (отношение количества вещества, включившегося в липосомы, к его общему количеству) определяли в двух параллельных экспериментах: гель-хроматографией и равновесным диализом [37] ЛП. Скорость выхода ФС IX из липосом оценивали, определяя через фиксированные промежутки времени количество ФС во внешнем растворе и относя его к общему количеству ФС IX, включившемуся в ЛФ. Фотостабильность заключенного в липосомы ФС оценивалась в “холостом” (см. “Эксперимент. часть”) опыте.

Концентрацию ФС IX определяли спектрофотометрически по поглощению при 402 нм (полоса Соре), где тетрапиррольные ФС обычно имеют молекулярный коэффициент поглощения 150000–200000 $M^{-1} cm^{-1}$. Такое определение является достаточно надежным ввиду высокой селективности и чувствительности метода (до 10^{-5} мг/мл или 10^{-8} M).

Диализ свободного ФС IX (рис. 2) показал, что равновесная концентрация (8.65 ± 0.53 мкг/мл) достигается приблизительно за 200 ч. Ожидаемая концентрация равна 8.60 мкг/мл. Это значение получается путем измерения концентрации ФС после растворения его аликвоты в объеме буферного раствора, равном диализному. Длительный временной интервал можно объяснить большими размерами и значительной молекулярной массой ФС IX (M 906 Да). В дальнейших экспериментах

по диализу было принято, что за это время система приходит в состояние равновесия.

Эффективность включения, определенная гель-фильтрацией, составила $62 \pm 4\%$. При этом содержание ФС IX в липосомном препарате равнялось 0.29 мг/мл (320 мкМ). Именно такая концентрация ФС IX (на два порядка меньше возможной) была необходима для дальнейших экспериментов по фототоксичности *in vitro*, а также целесообразна при проведении диализа. Во время диализа концентрацию ФС IX во внешнем растворе измеряли без отбора аликвоты и ее разбавления, так как оптическое поглощение в пределах единицы позволяло использовать для измерения сам внешний раствор.

Диализ липосомного препарата ФС IX показал (рис. 3), что равновесная концентрация составляет $2.68 \pm 0.25 \text{ мкг/мл}$. За 10 сут через внешнюю бислойную мембрану теряется 10% ФС, а в присутствии ФС во внешнем растворе этот процесс еще более замедляется (см. ниже), поэтому диффузией ФС из липидной мембраны в раствор пренебрегли. Расчет дает эффективность включения $69 \pm 3\%$, что хорошо согласуется с данными гель-фильтрации (см. выше).

Оценить количество ФС IX, включившееся в липидный бислой, можно при помощи одного из двух встречных экспериментов. В одном из них раствор ФС IX помещают в диализный мешочек совместно с незагруженными липосомами, в другом — внутрь диализного мешочка помещают незагруженные липосомы, а ФС IX во внешний раствор. Экспериментальные данные отражены сходящимися кривыми (рис. 4). В первом случае равновесная концентрация равна $4.04 \pm 0.13 \text{ мкг/мл}$, во втором — $4.07 \pm 0.77 \text{ мкг/мл}$. Это означает, что $40 \pm 4.5 \text{ мкг}$ из введенных 86 мкг ФС IX (см. “Эксперимент. часть”) остается в растворе, а $46 \pm 4.5 \text{ мкг}$ включается в бислой (если пренебречь диффузией ФС из мембраны во внутреннюю полярную фазу). Всего в липосомах, содержащих 16 мг липидов, содержится 58 мкг ФС IX (рассчитано исходя из данных, приведенных в предыдущем абзаце), причем это количество может относиться не только к полярной внутренней и неполярной наружной фазам, но и к фрагментам бислоя, присутствующим внутри МЛЛ, следовательно, во внутреннем водном объеме липосом растворено $\leq 12 \pm 3.5 \text{ мкг}$. Тогда состав ЛП фотосенсибилизатора (IX) можно представить следующим образом:

$$\begin{aligned} & \text{несвязанный ФС/мембраносвязанный} \\ & \text{ФС/внутрилипосомный ФС} = 28/\geq 46/\leq 12 \pm \\ & \pm 3.5 \text{ мкг} = 31/\geq 54/\leq 14 \pm 4\% \text{ в ЛП.} \end{aligned}$$

Концентрация ФС IX в липидной фазе составляет $0.28 \pm 0.03\%$ или 1.88 ммоль/моль . Средняя концентрация ФС IX в водной фазе ЛП равна $0.013 \pm 0.001\%$ (значение получено делением

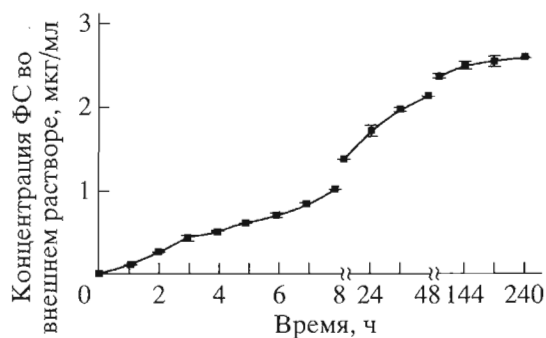


Рис. 3. Диализ липосомного препарата ФС (IX). Условия те же (см. рис. 2).

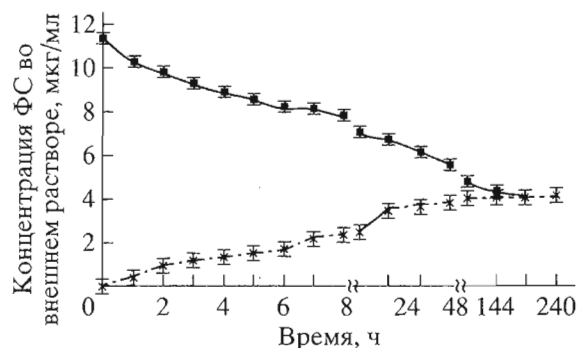


Рис. 4. Диализ ФС совместно с незагруженными липосомами (прерывистая линия) и “захват” ФС незагруженными липосомами из внешнего раствора (сплошная линия). Концентрация липидов во внутреннем растворе 3.2 мг/мл . Начальная концентрация ФС 17.2 мкг/мл .

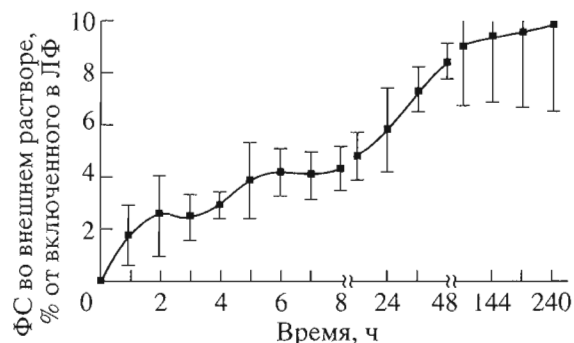


Рис. 5. Диализ нагруженных липосом, отделенных от несвязавшегося ФС (ЛФ). Концентрация липидов во внутреннем растворе 3.2 мг/мл . Начальная концентрация ФС 17.2 мкг/мл .

($0.028 + 0.012$) мг ФС IX на ($0.300 - 0.016$) мл)*, откуда видно, что ФС IX обладает высоким сродством к липидной фазе, имея K_p более 21.2 ± 1.6 для

* Сумма количеств ФС во внешнем и во внутреннем водном объемах и разность объемов всей пробы ЛП и взятых для получения ЛП липидов. Объем липидов рассчитывали исходя из приближения, что масса липидной смеси равна ее объему. Ошибка такого приближения менее 5%.

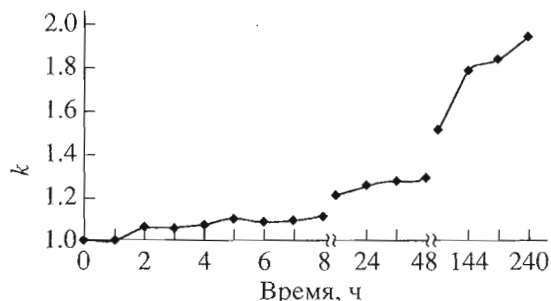


Рис. 6. Зависимость от времени поправочного коэффициента (k), учитывающего нестабильность ФС в процессе измерений.

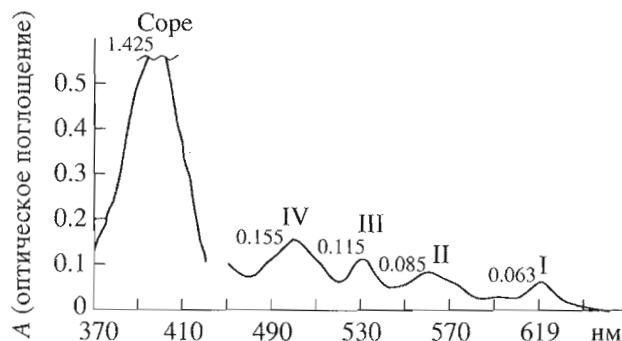


Рис. 7. Спектр поглощения 2,4-дигидрокси-ДП (ФС IX), снятый в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.0). Концентрация ФС 46.71 мкг/мл (для регистрации спектра в области полос I–IV) и 18.68 мкг/мл (для регистрации спектра в области полосы Соре – 402 нм).

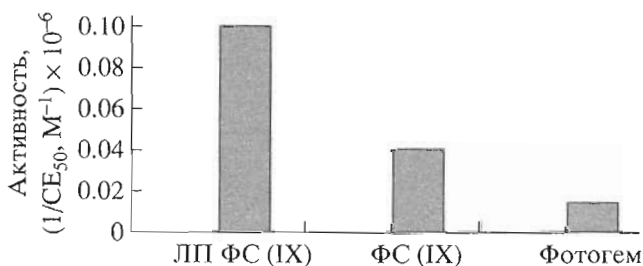


Рис. 8. Оценка фотоцитотоксической активности полученного ЛП фотосенсибилизатора (IX) *in vitro*. Культура клеток аденокарциномы яичника (CaOv). Дозы ФС IX (в растворе) – 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} М. Время инкубации ФС IX с клетками перед облучением 1.5–2 ч. Доза облучения 65 Дж на образец.

смеси ePC/Chol в соотношении 7 : 3 (моль/моль). Интересно сравнить это значение с коэффициентом распределения *n*-октанол/буфер, равным для этого ФС 17.0 ± 0.5 . Из сравнения следует, что модель *n*-октанол/фосфатный буфер, рН 7.4, достаточно близка к данной липосомной модели с точки зрения распределения ФС IX между неполярной и водной фазами.

Устойчивость липосом, загруженных ФС IX, а также скорость диффузии препарата из липидной

фазы в водный раствор можно оценить, подвергая диализу липосомы, отделенные гель-фильтрацией от свободного ФС IX (рис. 5).

Видно, что за 10 сут ЛФ теряет 5.5 ± 0.4 мкг ФС IX из 58, что составляет 9.8%. Это говорит о том, что скорость диффузии ФС IX из липидной фазы в раствор невелика. В присутствии свободного ФС IX, имеющегося в ЛП (в отличие от ЛФ), количество диффундировавшего в раствор ФС IX будет, таким образом, меньше погрешности определения его концентрации, поэтому в расчетах, приведенных выше, этой диффузией пренебрегли.

Несмотря на то, что весь эксперимент проводился, по возможности, при ограниченном доступе света, полученные величины концентраций необходимо было умножать на поправочный коэффициент k , характеризующий нестабильность ФС IX. Он определялся в параллельном эксперименте с буферным раствором ФС IX как отношение начальной концентрации ФС IX к его концентрации в момент времени τ (рис. 6).

Концентрацию ФС IX определяли спектрофотометрически при 402 нм. Формула для ее определения приведена в "Эксперимент. части". Спектр поглощения (IX) дан на рис. 7.

Интенсивная деструкция ФС IX (рис. 6) может быть связана с очень большим содержанием растворенного кислорода в его растворах, в то время как препарат брался в очень малых концентрациях. В реальных лекарственных формах ФС IX, представляющих собой высококонцентрированные растворы, сохраняемые без доступа кислорода, деструкция ФС IX невелика и сильно замедляется после исчерпания запаса растворенного кислорода.

Оценку фотоцитотоксичности (специфической активности) полученного липосомного препарата ФС IX проводили *in vitro* на культуре клеток аденокарциномы яичника CaOv. Препаратами сравнения служили раствор свободного ФС IX в 0.01%-ном растворе *N*-метил-*D*-глюкозамина и разрешенный к клиническому использованию препарат "Фотогем". Результаты представлены на рис. 8.

Видно, что активность полученного ЛП в 2.5 раза выше активности несвязанного ФС и в 7 раз превышает активность одного из ФС, предложенных для клинического использования. Первый факт можно объяснить тем, что липосомная форма облегчает взаимодействие ФС с клеточной мембраной. Известно [39], что фототоксическая активность амфифильных ФС связана, как правило, с их мембранной локализацией, причем амфифильные ФС в большей мере действуют на наружную клеточную мембрану [40]. Следовательно, путем подбора подходящего липидного состава ЛФ можно добиться дальнейшего роста эффективности ФДТ.

Второй факт (лучшие результаты по сравнению с препаратом "Фотогем"), по-видимому, связан со сравнительно более высоким сродством к липидной фазе, которым обладает ФС IX. Сродство к опухолевым клеткам для анионных ФС (именно такими являются ФС IX и остальные синтезированные нами ФС) зависит от их гидрофобности [41], что согласуется с данными о том, что константа в уравнении скорости диффузии для этих ФС близка к таковой для липидов (цит. лит. [39]). Гидрофобность же "Фотогема", как показывает его очень низкий K_p , невелика. Таким образом, с ростом липофильности препарата взаимодействие с плазматической мембраной облегчается, что согласуется с данными о тропности простых эфиров гематопорфирина-IX [32].

На основании полученных для ФС IX данных можно сделать вывод о том, что липосомные препараты и липосомные формы фотосенсибилизаторов перспективны для повышения эффективности их действия при ФДТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали диметилловые эфиры девяти производных порфиринов, полученные ранее в результате взаимодействия порфиринов, содержащих гидроксид/алкоксиэтильный боковой заместитель, с ацетилацетоном в присутствии ацетата цинка [19, 21] в виде диметилловых эфиров цинковых комплексов, из которых затем был удален цинк, а сложноеэфирные группы гидролизваны до карбоксильных: это 2-(1-метил-2-ацетил-3-оксобутил)дейтеропорфирин-IX (I), 4-(1-метил-2-ацетил-3-оксобутил)дейтеропорфирин-IX (IV) и 2,4-ди(1-метил-2-ацетил-3-оксобутил)дейтеропорфирин-IX (VII); дезацетилирования соединений (I), (IV) и (VII) в виде диметилловых эфиров цинковых комплексов в щелочных условиях [20, 21] и последующего удаления цинка (это дикислоты 2-(1-метил-3-оксобутил)дейтеропорфирина-IX (II), 4-(1-метил-3-оксобутил)дейтеропорфирина-IX (V) и 2,4-ди(1-метил-3-оксобутил)дейтеропорфирина-IX (VIII)); восстановления Zn-комплексов продуктов дезацетилирования борогидридом натрия с последующим удалением цинка [21] (это производные 2-(1-метил-3-гидроксibuтил)дейтеропорфирина-IX (III), 4-(1-метил-3-гидроксibuтил)дейтеропорфирина-IX (VI) и 2,4-ди(1-метил-3-гидроксibuтил)дейтеропорфирина-IX (IX)).

Препарат сравнения "Димегин" синтезирован по нашей методике [27]. Протопорфирин-IX, ди-натриевая соль (Fluka), был переведен в комплекс с *N*-метил-*D*-глюкозамином. Культура клеток рака яичника человека CaOv и клинический образец препарата "Фотогем" были предоставлены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Использовали натрия дезоксихолат (Serva, ФРГ), холестерин и яичный фосфатидилхолин (Биолек, Украина), се-

фадекс G-50 (Pharmacia, Швеция) и реактивы и материалы отечественного производства (Реахим): *n*-октанол ("х. ч."), питательную среду RPMI 1640, физиологический раствор, хлороформ ("ч. д. а."), эмбриональную сыворотку теленка, [³H]тимидин.

Для получения ЛП использовали ультразвуковую баню Cole-Parmer 8890 (Cole-Parmer, США). При определении K_p и проведении равновесного диализа использовали центрифугу J2-21 (Beckman, США), спектрофотометр Hitachi 557 (Япония) и диализную трубку 8 × 100 FT (Union Carbide Corp., США). Возбуждение ФС проводили с использованием установки для облучения на базе осветителя МТ-225 (ЛОМО, Россия) с тепловым (вода) и паспортизованными (СЗС-24 и ЖС-16) светофильтрами и паспортизованного измерителя мощности оптического излучения ИМО-4С. Радиоактивность измеряли с помощью счетчика 1219 Rack Beta Spectral (Wallak, Швеция).

Водорастворимые формы 2,4-ди(1-метил-3-гидроксibuтил)дейтеропорфирина-IX (ФС IX) и других ФС. Диметилловые эфиры 2,4-ди(1-метил-3-гидроксibuтил)дейтеропорфирина-IX или других ФС в количестве 20 мг (0.03 ммоль) растворяли в 1.5 мл 9 н. соляной кислоты и перемешивали 2 ч при 25°C. По каплям, при охлаждении ледяной водой и при перемешивании, прибавляли 3 мл 20% раствора КОН, экстрагировали негидролизованый и частично гидролизованый ФС хлороформом (10 мл × 2) и затем добавляли 5 мл буферного раствора с рН 4.95 (0.1 М раствора гидрата дикамменного лимоннокислого натрия). Выпавший тонкий хлопьевидный осадок дикислоты отделяли центрифугированием (9000 об/мин × 10 мин), промывали по одному разу тем же буфером (5 мл) и дистиллированной водой (2 мл). Сушили на воздухе. Выход 17 мг (0.025 ммоль, 83%). ФС переводили в водорастворимую форму путем взаимодействия с раствором *N*-метил-*D*-глюкозамина по методике [22].

Коэффициенты распределения в системе *n*-октанол/фосфатный буфер, рН 7.4. Встряхивали в течение 20 с 300 мл *n*-октанола и 300 мл фосфатного буферного раствора, рН 7.4, и для расслаивания центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. В подготовленных таким образом буферном растворе (2 мл) и *n*-октаноле (8 мл) растворяли по аликвоте ФС объемом 0.02–0.2 мл с концентрацией ФС 1–10 мг/мл и определяли максимум поглощения в диапазоне длин волн 380–420 нм (λ_{\max} различные у 9-ти ФС). Получали значения A_k^o и A_k^b , где *o* – *n*-октанол, *b* – фосфатный буфер, *k* – контроль. Равновесного распределения *n*-октанол/фосфатный буфер добивались, встряхивая при 20°C 2 мл фосфатного буфера и 8 мл *n*-октанола с соответствующей аликвотой ФС объемом 0.02–0.2 мл и концентрацией ФС 1–10 мг/мл в те-

чение 20 с с последующим центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин. Измеряя оптическое поглощение каждой из фаз при соответствующей максимуму поглощения длине волны в диапазоне 380–420 нм, получали значения A^o и A^b , где o – *n*-октанол, b – фосфатный буфер. В ряде случаев водную фазу разбавляли в 2–4 раза, чтобы значение оптического поглощения не превышало 1.5. K_p определяли по формуле:

$K_p = (A^o V^o A_k^o V_k^o) / (A^b V^b A_k^b V_k^b)$, где V^o – объем октанола, взятый для определения равновесного распределения (8 мл), V_k^o – объем октанола, насыщенного водой, взятый для контрольного определения поглощения аликвоты (8 мл), V^b – объем буфера, взятый для определения равновесного распределения (2 мл), V_k^b – объем буфера, насыщенного октанолом, взятый для контрольного определения поглощения аликвоты (2 мл). Эксперимент проводили в 3 повторениях и полученные значения K_p усредняли.

Получение липосомного препарата ФС IX.

Раствор ePC (0.82 мл 2% раствора в этаноле) и Chol (18 мг) (соотношение 7 : 3 (моль/моль)) совместно упаривали в круглодонной колбе до постоянной массы, высушивали в вакууме, после чего липидную пленку диспергировали механическим встряхиванием в течение 30 мин с 1.61 мл воды и 0.39 мл 0.14% раствора ФС IX в 0.01% водном растворе *N*-метил-*D*-глюкозамина. Таким образом получали дисперсный препарат МЛЛ с конечной концентрацией липидов 50 мг/мл и концентрацией ФС IX 270 мкг/мл (298 мкМ). Такой препарат удобен для экспериментов по фотоцитотоксичности, так как может быть разбавлен питательной клеточной средой в соотношении 1 : 2 (конц. [ФС IX] ~ 10^{-4} М), 1 : 29 ([ФС IX] ~ 10^{-5} М) и 1 : 299 ([ФС IX] ~ 10^{-6} М).

ЛП (0.1 мл) наносили на колонку с 15 мл сефадекса G-50 в физиологическом растворе и элюировали физиологическим раствором со скоростью 2 мл/мин. Собирали две фракции, поглощающие при 402 нм, первая из которых содержала нагруженные липосомы (ЛФ), а вторая – свободный ФС.

Концентрацию ФС IX в липосомах и степень включения в них вещества рассчитывали по данным измерения оптического поглощения при 402 нм после добавления к 2 мл фракции, содержащей липосомы, и к фракции, содержащей не включившийся ФС, по 0.1 мл 5.4% раствора SDC.

Расчетная формула:

$$\text{Включение ФС IX в липосомы (\%)} = \frac{A_1 V_1 \times 100}{A_1 V_1 + A_2 V_2},$$

где A_1 – оптическое поглощение фракции липосом после добавления SDC, A_2 – оптическое поглощение фракции не включившегося ФС IX по-

сле добавления SDC, V_1 – суммарный объем (мл) фракции липосом, V_2 – суммарный объем (мл) фракции не включившегося ФС IX.

Равновесный диализ. В пробирки со шлифами и пробками емкостью 25 мл помещали 5 мл фосфатного буфера, pH 7.4, еще 4.5–5 мл вносили внутрь каждого диализного мешочка. Эксперименты проводили на качалке при 20°C, в 3 повторениях каждый.

Диализ свободного ФС IX проводили следующим образом: 0.06 мл раствора ФС IX с концентрацией 1.43 мг/мл (86 мкг) диализовали против фосфатного буфера. Липосомный препарат ФС IX объемом 0.32 мл с концентрацией ФС IX 0.268 мг/мл (86 мкг) диализовали против фосфатного буфера; ФС IX совместно с незагруженными липосомами, 0.32 мл препарата незагруженных липосом и 0.06 мл раствора ФС IX с концентрацией 1.43 мг/мл (86 мкг) – против фосфатного буфера; липосомную форму ФС IX, 0.46 мл ЛФ (содержащей 86 мкг ФС IX) – против того же буфера. Для определения “захвата” ФС IX из внешнего раствора незагруженными липосомами диализовали 0.32 мл препарата незагруженных липосом в буфере против раствора 0.06 мл (86 мкг) ФС IX в буфере с начальной концентрацией ФС IX 1.43 мг/мл.

При определении временной зависимости поправочного коэффициента k , к 10 мл буферного раствора прибавляли 0.06 мл раствора ФС IX с концентрацией 1.43 мг/мл (86 мкг), измеряли падение концентрации ФС IX во времени и выражали k , как отношение исходной концентрации к концентрации в момент времени t .

Концентрацию ФС IX (в мкг/мл) вычисляли по формуле $C = 12.8 A_{cp}$, где 12.8 – коэффициент пересчета, связывающий концентрацию и оптическое поглощение (при 402 нм) эталона ФС IX, A_{cp} – усредненное значение оптического поглощения в эксперименте. Исправленные концентрации получали, умножая величину C на поправочный коэффициент k . Для определения концентраций на короткое время извлекали диализный мешочек, измеряли оптическое поглощение раствора и возвращали мешочек на место. Диализ считали завершенным, когда исправленная концентрация ФС IX во внешнем растворе начинала изменяться в пределах 10% ошибки опыта.

Возбуждение ФС. Для возбуждения ФС был использован широкополосный источник света в виде ксеноновой дуговой лампы мощностью 250 Вт, из интегрального спектра излучения которого с помощью теплового и паспортризованных светофильтров вырезалась полоса 350–630 нм. Интегральная интенсивность светового потока в центре площадки составляла 35 мВт/см² с колоколообразным спадом интенсивности на периферии зоны облучения до 24 мВт/см². Облучение клеточных культур проводили в пластиковых культу-

ральных флаконах (одновременно 6 флаконов диаметром 2.5 см каждый) так, что площадь клеточного монослоя составляла около 4 см², а экспозиционная доза облучения 16 Дж/см² или приблизительно 65 Дж на образец.

Оценку фотцитотоксической активности проводили *in vitro* на культуре клеток аденокарциномы яичника человека (линия CaOv), стандартно используемой в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН для скрининга новых противоопухолевых агентов. Клетки выращивали в монослое на среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, при 37°C. Испытываемые соединения в виде водных растворов добавляли в питательную среду до различных концентраций (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ М) (в форме ЛП – в расчете на ФС) и инкубировали 1.5–2 ч (для достижения естественного распределения ФС в клетках), проводили облучение и инкубировали в темноте 48 ч. За 1 ч до окончания срока инкубации в среду вводили [³H]тимидин в конечной концентрации 1 мкКи/мл. После инкубации клетки промывали раствором Хенкса, 2.5% хлорной кислотой и проводили гидролиз кислотонерастворимой фракции клеток 5% хлорной кислотой 20 мин при 80°C. Аликвоты гидролизатов вносили в сцинтилляционную жидкость ЖС-8 и определяли уровень радиоактивности образцов. Показателем активности ФС считали подавление включения [³H]тимидина в ДНК клеток, исходя из чего графически по кривой “доза–эффект” определяли половинную эффективную дозу (СЕ₅₀). Контролем служили образцы, подвергавшиеся тем же воздействиям, что и опытные, но без добавления ФС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов А.В. // Медицинская физика. 1996. Т. 3. С. 55–60.
2. Boyle R.W., Dolphin D. // Photochem. Photobiol. 1996. V. 64. P. 469–485.
3. Reshetnikov A.V., Babushkina T.A., Shvets V.I., Ponomarev G.V. // Abstracts of VIII Intern. Conference on Spectroscopy and Chemistry of Porphyrins and Their Analogs. Minsk, Belarus. 24–29 September 1998. P. 146.
4. Иванов А.В., Решетников А.В., Дмитриев А.А., Градюшко А.Т., Швец В.И., Пономарев Г.В. // Материалы второго съезда фотобиологов России. Пушино. 8–12 июня 1998. С. 362–364.
5. Reshetnikov A.V., Yashunsky D.V., Shvets V.I., Moser J.G., Ponomarev G.V. // Abstracts of XVI Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry (Section of Life Chemistry). Russia, SPb. 25–29 May 1998. P. 99–100.
6. Yarmush M.L., Thorpe W.P., Strong L., Rakestraw S., Toner M., Tompkins R. // Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Syst. 1993. V. 10. P. 197–252.
7. Klyashchitsky B.A., Nechaeva I.S., Ponomarev G.V. // J. of Controlled Release. 1994. V. 29. P. 1–16.
8. Dagan A., Gatt S., Cerbu-Karabat S., Maziere J.-K., Maziere C., Santus R., Engelhardt E.L., Yeh K.A., Stobbe C.C., Fenning M.C., Chapman J.D. // Int. J. Cancer. 1995. V. 63. P. 831–839.
9. Yemul S., Berger C., Estabrook A., Suarez S., Edelson R., Bayley H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 246–258.
10. Bergstrom L.C., Vucenic I., Hagen I.K., Chernomorsky S.A., Poretz R.D. // J. Photochem. Photobiol. 1994. V. 24. P. 17–23.
11. Akhlylina T.V., Jans D.A., Rozenkranz A.A., Statyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., Sobolev A.S. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 20328–20331.
12. Allen T.M. // Drugs. 1997. V. 54. Suppl. 4. P. 8–11.
13. Madden T.D., Harrigan P.R., Tai L.C. L., Bally M.B., Mayer L.D., Redelmeyer T., Loughrey H., Tilcock C. P.S., Reinish L.W., Cullis P.R. // Chem. Phys. Lipids. 1990. V. 53. P. 37–46.
14. Mayer L.D., Bally M.B., Loughrey H., Massin D., Cullis P.R. // Cancer Res. 1990. V. 50. P. 575–579.
15. Gabizon A., Barenholz Y., Bialer M. // Pharm. Res. 1993. V. 10. P. 703–708.
16. Lasic D.D., Papahajopoulos D. // Science. 1995. V. 267. P. 1275–1282.
17. Lasic D.D. Liposomes: From Physics To Applications. Amsterdam: Elsevier, 1993. P. 1–580.
18. Taylor R.W., Kauffman R.F., Pfeiffer D.R. The Polyether Antibiotics: Carbocyclic Ionophores. New York: Dekker, 1982. V. 1. P. 103–184.
19. Пономарев Г.В., Кириллова Г.В., Шульга А.М. // Химия гетероцикл. соед. 1991. № 11. С. 1564–1565.
20. Карнаух И.М., Московкин А.С., Пономарев Г.В. // Химия гетероцикл. соед. 1993. № 11. С. 1478–1483.
21. Решетников А.В., Бабушкина Т.А., Кириллова Г.В., Пономарев Г.В. // Химия гетероцикл. соед. 1999 (в печати).
22. Пономарев Г.В., Решетников А.В., Гусева-Донская Т.Н., Швец В.И., Баум Р.Ф., Ашмаров В.В. // Пат. России. Заявка № 98100545 (01/1998).
23. Kessel D. // Biochemistry. 1977. V. 16. P. 3443–3449.
24. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Publishing, Inc. 2nd Ed. 1989. V. 1. P. 380.
25. Жамкочан Г.А., Кириллова Г.В., Пономарев Г.В., Романовичев Ю.А., Сухин Г.М., Черненко О.В., Ярцев Е.И., Яшунский В.Г. // Пат. России 11160710 (04/1984) / Б.И. 1996. № 7. / С.А. 1997. V. 126. 59813г.
26. Назиров Ш.Б., Литвин Г.Д., Кац В.А., Кириллова Г.В., Колобанов А.С. // Тез. докл. XIII выездной сессии Всесоюзного семинара по химии порфиринов и их аналогов. 21–25 октября 1991. Самарканд, Узбекистан. С. 126.
27. Ivanov A.V., Gradyushko A.T., Laptev V.P., Panferova N.G., Varlamov V.P., Klyashchitsky B.A., Reshetnikov A.V., Ponomarev G.V. // Proc. SPIE. CIS Selected Papers “Laser Use in Oncology”. 1996. V. 2728. P. 181–193.

28. Fickweiler S., Szeimies R.-M., Abels C., Ponomarev G.V., Hofstadter F., Wolfbeis O.S., Landhalter M. // Photodermatol. Photoimmunol. Photomed. 1998. V. 14. P. 125–131.
29. Миронов А.Ф. // Тез. докл. V Всес. конф. по координационной и физической химии порфиринов. 12–15 мая 1988. Иваново, Россия. С. 13.
30. Миронов А.Ф., Нокель А.Ю., Скобелкин О.К., Чиссов В.И., Соколов В.В., Странадоко Е.Ф. // Пат. России 2063971 (11/1993) / Б.И. 1996. № 20. С. 207 / С.А. 1997. V. 126. 305494z.
31. Dougherty T.J. // Photochem. Photobiol. 1987. V. 46. P. 569–573.
32. Evensen J.R., Sommer S., Rimington C., Moan J. // Br. J. Cancer. 1987. V. 55. P. 483–486. // С.А. 1987. V. 107. 73463r.
33. Harrigan P.R., Wang K.F., Redelmeyer T.E., Wheeler J.J., Cullis P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V. 1149. P. 329–338.
34. Cullis P.R., Hope M.J., Bally M.B., Madden T.D., Mayer L.D., Fenske D.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1331. P. 187–211.
35. Gregoriadis G., Ryman B.E. // Biochem. J. 1972. V. 129. P. 123–133.
36. Mayer L.D., Bally M.B., Hope M.J., Cullis P.R. // Chem. Phys. Lip. 1986. V. 40. P. 333–345.
37. Lurie E., Kaplun A., Vassilenko I., Dubovskii P., Shvets V. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1235. P. 256–262.
38. Gregoriadis G., Kirby C. // Biotechnology. 1984. № 11. P. 979–984.
39. Moan J., Berg K. // Photochem. Photobiol. 1992. V. 55. P. 931–948.
40. Pass H.I. // J. Nat. Cancer Inst. 1993. V. 85. P. 443–456.
41. Moan J., Peng Q., Evensen J.F., Berg K., Western A., Rimington C. // Photochem. Photobiol. 1987. V. 46. P. 713–721.

The Preparation and Some Properties of a Liposome Formulation of 2,4-Di(1-methyl-3-hydroxybutyl)deuteroporphyrin IX

A. V. Reshetnikov*, I. V. Zhigal'tsev*, S. N. Kolomeichuk*, A. P. Kaplun[#], V. I. Shvets*, O. S. Zhukova**, A. V. Karmenyan**, A. V. Ivanov**, and G. V. Ponomarev***

*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Kashirskoe sh. 24, Moscow, 115478 Russia

***Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832 Russia

A liposome preparation of a porphyrin photosensitizer for photodynamic therapy of tumors (PDT) was obtained. The *in vitro* efficiency of the photosensitizer was enhanced 2.5-fold through the liposome formulation. The composition and some properties of the new preparation were studied. An algorithm for a complex approach to the prediction of photosensitizer efficiencies by model experiments *in vitro* was developed. This approach is based on the use of two models: the determination of coefficient of distribution between *n*-octanol and a phosphate buffer, pH 7.4, and the determination of the cytotoxic effect on the culture of CaOv ovarian adenocarcinoma cells.

Key words: liposomes, porphyrins, photodynamic therapy, photosensitizers

[#] To whom correspondence should be addressed; e-mail: kapa3155@glasnet.ru; phone: +7 (095) 434-8355.