

УДК 678.07:617

## ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ХЛОРАМБУЦИЛА И ЭТОПОЗИДА ИЗ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

© 2012 г. Е. В. Филатова\*, С. Г. Яковлев\*, А. П. Бонарцев\*, \*\*, Т. К. Махина\*, В. Л. Мышкина\*, Г. А. Бонарцева\*

\*Институт биохимии им. А.Н. Баха, РАН, Москва, 119071, e-mail: bonar@inbi.ras.ru

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119992

Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

Получены микросферы на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) с включением в полимерную матрицу цитостатических лекарственных веществ (ЛВ) хлорамбуцила и этопозид, изучены морфология, кинетика высвобождения ЛВ из микросфер и взаимодействие микросфер с опухолевыми клетками рака молочной железы человека линии МФС-7 *in vitro*. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролонгированное высвобождение ЛВ происходит за счет диффузии лекарственного вещества из полимерной матрицы на начальном этапе и за счет гидролитической деструкции полимера на более поздних этапах. При изучении биосовместимости и биологической активности биополимерных микросфер показано, что хлорамбуцил сильнее подавляет рост культивируемых опухолевых клеток за короткое время (24 ч). Этопозид действует слабее (подавление роста клеток за 48 ч не превышает 50%), однако в дальнейшем он имеет долгий пролонгированный эффект высвобождения ЛВ из полимерной матрицы. Изучаемая система может послужить основой создания новых лекарственных форм пролонгированного действия этопозид и хлорамбуцила для терапии онкозаболеваний.

Современное состояние химиотерапии для лечения онкологических заболеваний указывает на необходимость улучшения терапевтической эффективности противоопухолевых средств. Современный цитостатический препарат должен отвечать следующим требованиям: обладать высокой эффективностью при постоянной заранее заданной концентрации в опухоли и, в то же время, проявлять низкую системную токсичность и большую продолжительность действия. Для достижения этих условий возможно создание макромолекулярных терапевтических систем с контролируемым высвобождением ЛВ, то есть создание конъюгатов лекарственных препаратов с полимерным носителем.

В качестве полимерного носителя в своей работе мы использовали поли-3-оксибутират – биоразлагаемый термопластик, обладающий хорошей биосовместимостью и способностью полностью разлагаться в организме человека до CO<sub>2</sub> и воды [1–3]. К настоящему времени разработаны технические условия и регламент получения медицинского поли-3-оксибутирата (ПОБ), показано, что полимер поли-3-оксибутират нетоксичен, не обладает раздражающим и сенсibiliзирующим действием, отвечает требованиям нормативной документации при фармацевтическом использовании и применим для парентерального и перорального применения [3, 4]. Поли-3-оксибутират активно используется для создания и исследова-

ния систем пролонгированного высвобождения широкого спектра лекарственных веществ (ЛВ) [5, 6]. Постепенное высвобождение ЛВ из биополимерной матрицы обеспечивает длительное поддержание необходимой концентрации действующего вещества в организме или локально в определенном органе, или ткани. Тем самым, устраняется необходимость дополнительного многократного введения ЛВ, снижается его токсичность и побочные эффекты, повышается стабильность ЛВ и его эффективность за счет равномерной скорости подачи. Это является особенно актуальным для препаратов, применяемых в онкотерапии, так как они обладают высокой токсичностью и вызывают ряд тяжелых осложнений у пациентов.

При создании систем контролируемого высвобождения ЛВ мы использовали два противоопухолевых препарата – Хлорамбуцил и Этопозид. В традиционных лекарственных формах они вызывают ряд осложнений [7], поэтому целесообразно использование пролонгированных лекарственных форм этих препаратов. Использование биосовместимых полимеров, например поли-3-оксибутирата, в качестве основы для таких форм, могло бы не только устранить многие недостатки использования традиционных лекарственных форм онкопрепаратов, но и позволило бы контролировать количество и время высвобождения ЛВ. Ранее нами было показано, что путем варьирования моле-

кулярной массы ПОБ и размера полимерных частиц также можно влиять на скорость высвобождения ЛВ из полимерной основы ПОБ [8–10].

Цель работы – получение и исследование свойств пролонгированных лекарственных форм хлорамбуцила и этопозид, создание биополимерных microspheres на основе поли-3-оксибутирата, содержащих цитостатическое ЛВ – хлорамбуцил или этопозид; исследование кинетики выхода ЛВ из microspheres, изучение биосовместимости и их биологической активности на культуре клеток *in vitro*.

## МЕТОДИКА

**Материалы.** Для получения биополимерных microspheres в работе использовали поли-3-оксибутират (Мм 236 кДа), полученный микробиологическим путем. В качестве продуцента ПОБ был использован штамм *Azotobacter chlorococcum* 7Б [10]. Используются: ЛВ – хлорамбуцил и этопозид (“Sigma”, Германия), хлороформ (“Экос-1”, Россия), поливиниловый спирт (“MP Biomedicals”, США).

**Получение поли-3-оксибутирата.** Использовали штамм-продуцент ПОБ *A. chroococcum* 7Б, способный синтезировать до 80% ПОБ от сухой массы клеток. Для достижения сверхсинтеза ПОБ культуру *A. chroococcum* выращивали на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода (г/л):  $MgSO_4 \cdot 7H_2O - 0.4$ ;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O - 0.01$ ;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O - 0.006$ ; цитрат Na – 0.5;  $CaCl_2 - 0.1$ ;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O - 1.05$ ;  $KH_2PO_4 - 0.2$ ; сахара – 40; в течение 48 ч в аэробных условиях при 28°C. Выход сухой биомассы составлял 10 г/л среды. Содержание полимера в клетках *A. chroococcum* – 76% от сухой массы клеток.

Выделение и очистка полимера из биомассы *A. chroococcum* включали растворение ПОБ в хлороформе путем встряхивания на качалке при 37°C в течение 12 ч, отделение раствора ПОБ от клеточных остатков фильтрованием, выделение ПОБ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом. После трехкратного перерастворения ПОБ в хлороформе и осаждения изопропанолом очистку завершали высушиванием полимера на воздухе при 60°C. Молекулярную массу полимера определяли методом вискозиметрии: вязкость раствора ПОБ в хлороформе измеряли при 30°C в вискозиметре “RT RHEOTEC” (“RheoTec”, Германия). Молекулярную массу вычисляли по уравнению Марка–Хаувинка–Куна, используя следующие коэффициенты  $[\eta] = 7.7 \times 10^{-5} M^{0.82}$ , где  $\eta$  – вязкость, M – молекулярная масса ПОБ [11].

**Получение микрочастиц из ПОБ.** Microspheres были получены с помощью метода одноэтапного эмульгирования раствора ЛВ с ПОБ в хлороформе

с последующим испарением растворителя [10]. Этот метод был адаптирован для инкапсулирования хлорамбуцила и этопозид. Раствор ЛВ и ПОБ с молекулярной массой 236 кДа в соотношении 1 : 4 в 8 мл хлороформа постепенно добавляли к 100 мл поливинилового спирта в дистиллированной воде с концентрацией 1.5% масс./об. при перемешивании. Перемешивание проводили в течение 2 ч при помощи механической верхнеприводной мешалки RZR 2021 (“Heidolph”, Германия) при 1000 об/мин. После полного испарения органического растворителя microspheres отделяли центрифугированием (6 мин при 3000 g), центрифуга 5702 R (“Eppendorf”, Германия), затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора и ЛВ с поверхности сфер. Microspheres высушивали в термостате при 37°C.

**Определение размера microspheres из ПОБ и содержания в них ЛВ.** Средний диаметр у полученных партий microspheres определяли по микрофотографиям, полученным с помощью светового микроскопа Биомед 1 Вар. 2 (“Биомед”, Россия) с цифровым окуляром Mscope 300M (“Webbers”, Тайвань).

Содержание хлорамбуцила и этопозид в microspheres определялось спектрофотометрически после их растворения в хлороформе путем измерения поглощения света на спектрофотометре DU-650 (“Beckman Coulter”, США) (максимумы поглощения при 259 и 305 нм для хлорамбуцила и 288 нм для этопозид) при сравнении с контрольным раствором ПОБ в хлороформе и с помощью построения калибровочной кривой с использованием растворов в хлороформе ПОБ и ЛВ в различных концентрациях.

**Кинетика высвобождения ЛВ из microspheres на основе ПОБ.** Эксперимент по высвобождению хлорамбуцила и этопозид из microspheres *in vitro* проводили при 37°C в термостате ТС-1/80 СПУ (“Лабтех”, Россия) в 25 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7.4) с небольшим добавлением эмульгатора (0.05% Triton X-10 по объему): 4 партии по 20 мг microspheres в 4 мл буфера перемешивали на шейкере (“BioSan”, США) при 330 об/мин. Через определенные промежутки времени (через 1, 2, 3 ч и т.д.) microspheres отделяли от буфера центрифугированием при 14100 g на центрифуге MiniSpin Plus, (“Eppendorf”, Германия) и добавляли 4 мл свежего буфера. Содержание ЛВ в буфере определяли на спектрофотометре DU-650 (“Beckman Coulter”, США) с помощью построения калибровочной кривой с использованием водных растворов ЛВ в различных концентрациях. Остаточное содержание ЛВ в microspheres определяли также спектрофотометрически, растворяя их в хлороформе.

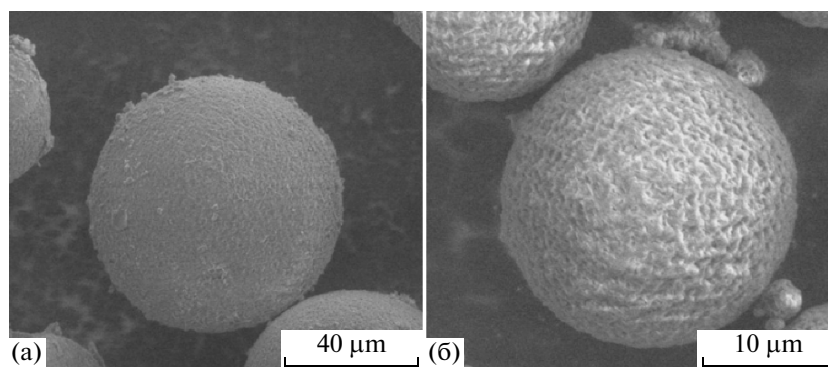


Рис. 1. Микрофотографии полученных микрочастиц (электронная микроскопия): хлорамбуцил (а); этопозид (б).

**Микроскопия.** Первичное изучение свойств микрочастиц и их морфологии проводилось с помощью световой микроскопии (микроскоп Биомед 1 Вар. 2 (“Биомед”, Россия) с цифровым окуляром MUSE 300M (“Webbers”, Тайвань)). Микрофотографии микрочастиц были получены методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в электронном и ионном излучениях (микроскоп FEI-SMA-QUANTA 200, и SMA QUANTA FEG, “FEI Company”, США).

**Взаимодействия микросфер с культурой клеток *in vitro*.** Для оценки биобезопасности микросфер *in vitro* использовали культуру клеток рака молочной железы человека линии MCF-7. Клетки культивировали с использованием методов, описанных Фрешни [12]. Выживаемость клеток под влиянием тестируемого агента вычисляли по формуле (1), где  $S$  – выживаемость клеток,  $N_{\text{оп}}$  – количество живых клеток в опыте,  $N_{\text{контр}}$  – кол-во живых клеток в контроле.

$$S = \frac{N_{\text{оп}}}{N_{\text{контр}}} \times 100\%. \quad (1)$$

При этом применялся стандартный МТТ-тест (с использованием в качестве красителя водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ)), как наиболее показательный метод при работе с культурами опухолевых клеток [12]. Микросферы диспергировали в среде культивирования и добавляли к культивируемым клеткам в различных концентрациях. Предварительно сухие микросферы стерилизовали при 100°C в течение 10 мин. Микросферы тестировали в 4 параллельных измерениях при концентрации 3 мг/мл. Суспензию биополимерных микросфер, не содержащих ЛВ (конц. 3 мг/мл), использовали в качестве отрицательного контроля. Измерения проводили через 24 и 48 ч после начала культивации.

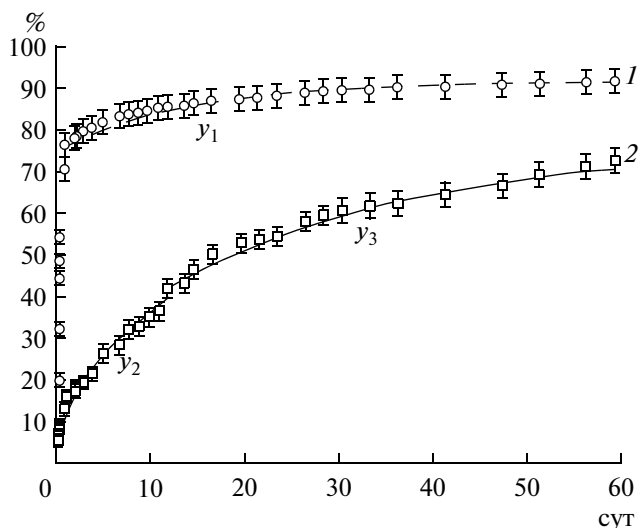
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения микросфер из ПОБ с инкапсулированным ЛВ применялся метод одноэтапного эмульгирования [10]. Были получены микросферы с массовой долей хлорамбуцила в полимере 12%. Средний диаметр составил 24 мкм. Также были получены микросферы с массовой долей этопозиды в полимере 10%, средний диаметр составил 28 мкм.

Для более детального изучения свойств микрочастиц и структуры их поверхности использовалась электронная сканирующая микроскопия. На полученных микрофотографиях (рис. 1) видно, что поверхность сфер шероховатая с отчетливо различимыми тяжами полимера. Причем микрочастицы с хлорамбуцилом имеют более гладкую поверхность, чем частицы с этопозидом, что, по-видимому, объясняется различной степенью гидрофобности включаемых веществ и полимерной основы.

Исследована кинетика выхода хлорамбуцила и этопозиды из полимерной матрицы *in vitro* в 0.025 М фосфатном буфере, рН 7.4 при 37°C (рис. 2). Полученные результаты показывают, что первая фаза выходы хлорамбуцила из полимерной матрицы характеризуется большим выбросом ЛВ, т.н. **берст-эффект**, который, видимо, объясняется слабым гидрофобным взаимодействием между лекарством и полимером. На следующей фазе высвобождения ЛВ преобладают диффузионные процессы между ЛВ и водной средой, поэтому кинетический профиль характеризуется степенной функцией. На более поздних этапах выход ЛВ становится постоянным и практически линейным.

На рис. 2 видно, что высвобождение этопозиды протекает менее активно, чем хлорамбуцила, при этом отсутствует ярко выраженный берст-эффект. Такое различие, видимо, объясняется большим сродством этопозиды к ПОБ, чем у хлорамбуцила, за счет гидрофобных взаимодействий между полимером и ЛВ, что способствует увеличению времени контролируемого высвобождения.



**Рис. 2.** Кинетика выхода (%) ЛВ из микросфер на основе ПОБ (0.025 М фосфатный буфер, рН 7.4, при 37°C): 1 – микросферы с хлорамбуцилом (средний диаметр – 24 мкм, включение – 12%);  $y_1 = 1 + m_1 \exp(-k_1 x)$ ,  $m_1 \sim -0.6$ ; 2 – микросферы с этопози-дом (средний диаметр – 28 мкм, включение – 10%);  $y_2 = a_2 x b_2 + c_2 x$ ,  $b_2 \sim 0.5$ ;  $y_3 = 1 + m_3 \exp(-k_3 x)$ ,  $m_3 \sim -0.6$ .

ния ЛВ по сравнению с более гидрофильным веществом хлорамбуцилом [13]. Выход этопозида длится дольше, чем хлорамбуцила, что позволяет достигнуть более пролонгированного эффекта, который также связан с тесным гидрофобным взаимодействием этопозида с ПОБ [14].

В случае выхода этопозида, полученный кинетический профиль на начальных этапах (1–10 сут) аппроксимируется сложной степенной функцией с показателем степени, близким к 0.5 (рис. 2), что соответствует уравнению диффузии (2) [15, 16], описывающему выход вещества из полимерных микросфер, где  $M_t$  и  $M_0$  – количества высвободившегося и изначально загруженного ЛВ в полимерную матрицу (мг) в момент времени  $t$  (с),  $r$  –

радиус микросфер ( $m$ ,  $24 \times 10^{-6}$  и  $28 \times 10^{-6}$  м в нашем случае) и  $D$  – коэффициент диффузии.

$$\frac{M_t}{M_0} = 6 \left( \frac{Dt}{r^2 \pi} \right)^{1/2} - \frac{3Dt}{r^2}. \quad (2)$$

Если на первой стадии высвобождения этопозида из микросфер преобладают диффузионные процессы между водным буфером и ЛВ, то на более поздних этапах диффузия уступает место гидролитической деградации полимерной основы, что и объясняет линейность скорости выхода ЛВ. На этих поздних этапах выхода этопозида (12–60 сут) кинетические профили аппроксимируются экспоненциальной функцией (рис. 2), что согласуется с описанной ранее [15, 16] зависимостью (3), где  $M_t$  и  $M_0$  – количества высвободившегося и изначально загруженного ЛВ в полимерную матрицу (мг) в момент времени  $t$  (с),  $r$  – радиус микросфер ( $m$ ) и  $D$  – коэффициент диффузии.

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - \frac{6}{\pi^2} e^{\left( \frac{-\pi^2 Dt}{r^2} \right)}. \quad (3)$$

В случае высвобождения хлорамбуцила, из-за его высоких гидрофильных свойств, основная часть ЛВ (около 70%) вымывается из полимерной основы за 1 сут. Поэтому диффузионная стадия выхода протекает быстрее (по сравнению с выходом этопозида) и практически полностью соответствует берст-эффекту (начальному выбросу ЛВ), а все последующее высвобождение хлорамбуцила протекает в основном за счет деградации полимерной основы микрочастиц, поэтому эта часть кинетического профиля (3–60 сут) характеризуется экспоненциальной зависимостью (рис. 2).

Различные стадии деградации хорошо видны на фотографиях, сделанных с помощью световой микроскопии на разных этапах эксперимента (рис. 3). Из полученных данных видно, что деградация микросфер с хлорамбуцилом отчетливо проявляется на 30 сут инкубации в фосфатном бу-



**Рис. 3.** Микрофотографии гидролитической деградации биополимерных микросфер на основе ПОБ с инкапсулированным хлорамбуцилом (световая микроскопия): а – 1, б – 15, в – 30 сут.

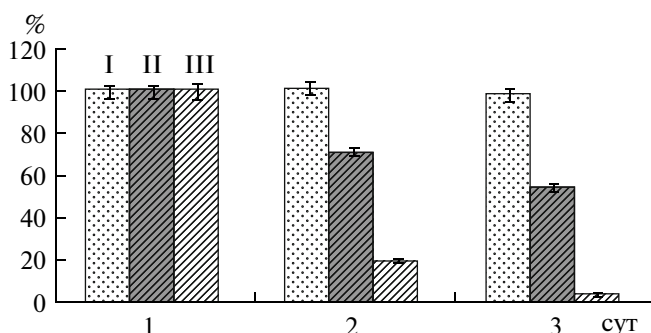


Рис. 4. Диаграмма выживаемости (%) клеток при культивации с микросферами, содержащими: I – без добавок, II – этопозид, III – хлорамбуцил.

фере. На 90 сут инкубации микросферы теряют свои очертания, представляя собой уже аморфную полимерную массу. Деградиация микросфер с этопозидом имела те же стадии и не имела принципиальных отличий от деградации микросфер с хлорамбуцилом.

Последний этап работы состоял в исследовании взаимодействия микросфер из ПОБ с инкапсулированным хлорамбуцилом и этопозидом с опухолевыми клетками рака молочной железы человека МФС-7. В течение 48 ч опухолевые клетки культивировали с чистыми полимерными микросферами (не несущими ЛВ), а также со сферами с инкапсулированным хлорамбуцилом и этопозидом. Полученные результаты эксперимента представлены на диаграмме зависимости выживаемости клеток от продолжительности инкубации их с микросферами (рис. 4).

Из полученных результатов можно сделать вывод о том, что полимерные сферы без лекарственных веществ являются биосовместимыми с опухолевыми клетками и не проявляют цитотоксичности. Микросферы на основе ПОБ с этопозидом уже за 24 ч подавляли рост опухолевых клеток на 28%, через 48 ч инкубации процент подавления роста клеток достигал 45%. Микросферы на основе ПОБ с хлорамбуцилом угнетали рост культивируемых клеток еще активнее. За 24 ч культивирования микросфер с хлорамбуцилом количество культивируемых опухолевых клеток снизилось в пять раз, а за 48 ч процент подавления роста клеток достигал 96%.

Таким образом, основываясь на полученных результатах сравнительного изучения влияния полимерных сфер с этопозидом и хлорамбуцилом на подавление роста культуры опухолевых клеток рака молочной железы человека можно сделать вывод, что полимерные сферы с этопозидом и хлорамбуцилом имеют различное токсичное воздействие на культуру опухолевых клеток, а именно: хлорамбуцил действует активнее и сильнее подавляет рост культивируемых клеток за корот-

кое время (80% за 24 ч, рис. 4). По данным кинетики выхода за первые 2 сут процент высвобождения ЛВ из матрицы достигал 80% (рис. 2). Этопозид действует слабее (процент подавления роста клеток за 48 ч не превышал 50%), однако в дальнейшем (по данным исследования кинетики выхода *in vitro* (рис. 2)) он имеет длительный пролонгированный эффект высвобождения ЛВ из полимерной матрицы. Хлорамбуцил может быть использован для нанесения первичного шокового удара на опухолевые клетки с дальнейшим длительным поддерживающим цитотоксическим эффектом. Этопозид же может быть использован для проведения длительной онкотерапии, так как матричная система на его основе позволяет поддерживать действующую терапевтическую дозу этопозида благодаря его постоянному высвобождению.

\*\*\*

Получены микросферы на основе биосовместимого и биоразлагаемого полимера поли-3-оксибутирата с включением цитостатических лекарственных веществ хлорамбуцила и этопозида. Изучена кинетика пролонгированного высвобождения лекарственных веществ хлорамбуцила и этопозида из микросфер. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролонгированное высвобождение происходит за счет диффузии лекарственного вещества из полимерной матрицы на начальном этапе, и за счет гидролитической деструкции полимера на более поздних этапах.

На основе анализа кинетики высвобождения изученных ЛВ *in vitro*, а также анализа результатов экспериментов на культуре клеток ткани выявлены принципиальные отличия полученных пролонгированных лекарственных форм хлорамбуцила и этопозида. Хлорамбуцил действует активнее и сильнее подавляет рост культивируемых клеток за короткое время (24 ч). Этопозид действует слабее (процент подавления роста клеток за 48 ч не превышает 50%), однако в дальнейшем он имеет длительный пролонгирующий эффект высвобождения из полимерной матрицы, что может быть оптимально при проведении онкотерапии.

Таким образом, результаты, полученные в данной работе, могут послужить основой для создания и изучения новых пролонгированных лекарственных форм этопозида и хлорамбуцила. Качественно отличные друг от друга пролонгированные формы этопозида и хлорамбуцила могут быть использованы для оптимального выбора тактики лечения онкологического заболевания у пациента.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК № 16.512.11.2019, ГК № П548, ГК № 16.740.11.0652 Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разра-

ботки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” с использованием оборудования Центров коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова и Института биохимии им. А.Н. Баха РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen G.Q., Wu Q.* // *Biomaterials*. 2005. № 26. P. 6565–6578.
2. *Park J., Ye M., Park K.* // *Molecules*. 2005. V. 1. № 10. P. 146–161.
3. *Босхмоджиев А.П., Бонарцев А.П., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Багров Д.В., Филатова Е.В., Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л.* // *Пластические массы*. 2009. № 8. С. 13–18.
4. *Босхмоджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А.* // *Биомедицинская химия*. 2009. Т. 55. № 6. С. 625–635.
5. *Bonartsev A.P., Livshits V.A., Makhina T.A., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L.* // *Express Polym. Lett.* 2007. V. 12. № 1. P. 797–803.
6. *Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E.* // *Polymers Res. J.* 2008. № 2. V. 2. P. 127–160.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации. М.: Науч. центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. Изд. XII. 696 с.
8. *Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Лучинина Е.С., Лившиц В.А., Босхмоджиев А.П., Маркин В.С., Иорданский А.Л.* // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2006. Т. 42. № 6. С. 710–715.
9. *Косенко Р.Ю., Иорданский А.Л., Маркин В.С., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А.* // *Хим.-фармацевт. ж.* 2006. Т. 41. № 12. С. 27–30.
10. *Лившиц В.А., Бонарцев А.П., Иорданский А.Л., Иванов Е.А., Махина Т.А., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А.* // *Высокомолекул. соедин.* 2009. Т. 51. № 7. С. 1243–1251.
11. *Фрешни Р.Я.* *Культура животных клеток : практическое руководство*. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010. 691 с.
12. *Akita S., Einada Y., Miyaki Y., Fugita H.* // *Macromolecules*. 1976. № 9. P. 774–780.
13. *Fundueanu G., Constantin M., Ascenzi P.* // *Acta Biomater.* 2009. V. 1. № 5. P. 363–373.
14. *Yao B., Ni C., Xiong C., Zhu C., Huang B.* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2010. V. 4. № 33. P. 457–63.
15. *Arifin D.Y., Lee L.Y., Wang C.-H.* // *Advanced Drug Delivery Rev.* 2006. № 58. P. 1274–1325.
16. *Baker R.* *Controlled Release of Biologically Active Agents*. N.Y.: Acad. Press, 1987. 279 p.

## Prolonged Release of Chlorambucil and Etoposide from Poly-3-Oxybutyrate-Based Microspheres

E. V. Filatova<sup>a</sup>, S. G. Yakovlev<sup>a</sup>, A. P. Bonartsev<sup>a, b</sup>, T. K. Makhina<sup>a</sup>,  
V. L. Myshkina<sup>a</sup>, and G. A. Bonartseva<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*  
e-mail: bonar@inbi.ras.ru

<sup>b</sup> *Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

Received August 26, 2011

**Abstract**—Microspheres were obtained on the basis of poly(3-oxibutyrate) (POB) with the inclusion of the Chlorambucil and Etoposide cytostatic drugs in a polymer matrix, and the morphology, kinetics of drug release from microspheres, and the interaction between microspheres and tumor cells in vitro were studied. Data on the kinetics of drug release suggests that a prolonged release occurs by drug diffusion from the polymer matrix at the initial stage and at the expense of hydrolytic degradation of the polymer at a later stage. A study of the biocompatibility and biological activity of biopolymeric microspheres showed that chlorambucil operates actively and strongly inhibits the growth of cultured cells for a short time (24 h). Etoposide acts weaker (the percentage of cell growth suppression during 48 h does not exceed 50%), but subsequently it has a basis for the creation of new dosage forms with prolonged action of Etoposide and chlorambucil for cancer therapy.