



Разработка инъекционной формы 4'-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида на основе человеческого сывороточного альбумина для химиотерапии рака молочной железы

Т. С. Ковшова¹, С. А. Бойко¹✉, М. А. Меркулова¹, Н. С. Осипова¹, Н. И. Моисеева²,
Ю. А. Малиновская¹, С. Н. Мантров¹, С. Э. Гельперина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» (РХТУ им. Д. И. Менделеева), 125047, Россия, г. Москва, Миусская площадь, д. 9

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23

✉ Контактное лицо: Бойко Светлана Андреевна. E-mail: 718bsvetlana@gmail.com

ORCID: Т. С. Ковшова – <https://orcid.org/0000-0002-0398-4645>; С. А. Бойко – <https://orcid.org/0000-0001-7793-2007>; М. А. Меркулова – <https://orcid.org/0000-0001-9649-1462>;
Н. С. Осипова – <https://orcid.org/0000-0002-2814-9064>; Н. И. Моисеева – <https://orcid.org/0000-0001-6697-7154>; Ю. А. Малиновская – <https://orcid.org/0000-0002-9771-3992>;
С. Н. Мантров – <https://orcid.org/0000-0002-0188-5125>; С. Э. Гельперина – <https://orcid.org/0000-0003-1113-6715>.

Статья поступила: 03.08.2022

Статья принята в печать: 03.07.2023

Статья опубликована: 25.08.2023

Резюме

Введение. Одним из эффективных подходов к получению инъекционных форм труднорастворимых лекарственных веществ является получение их наносуспензий, стабилизированных альбумином. Примером успешного применения этой технологии является препарат Abрахане® (nab™-паклитаксел, от англ. Nanoparticle albumin-bound, Celgene Corporation). В настоящем исследовании этот подход использован для получения инъекционной формы труднорастворимого пролекарства этопозида.

Цель. Получение инъекционной формы нового 4'-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида (ETP-cbz) на основе человеческого сывороточного альбумина и изучение ее цитотоксичности на клетках рака молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. Структуру ETP-cbz подтверждали методами ЯМР-спектроскопии и элементного анализа. Значения log P рассчитаны *in silico* с использованием Molinspiration Cheminformatics. Наночастицы ETP-cbz, стабилизированные альбумином (ETP-cbz-HSA), получены методом гомогенизации под давлением. Размер, распределение частиц по размерам и концентрацию дезинтеграции определяли методами динамического рассеивания света (ДРС) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Содержание ETP-cbz и альбумина в форме определяли методом ВЭЖХ. Конверсию ETP-cbz в этопозид изучали в модельной среде в присутствии эстеразы. Цитотоксичность ETP-cbz-HSA в сравнении с этопозидом и свободным ETP-cbz оценивали на клетках РМЖ (HBL-100 и MCF-7) при помощи колориметрического МТТ-теста.

Результаты и обсуждение. Синтезировано новое производное этопозида, обладающее более высокой по сравнению с этопозидом гидрофобностью (log P 2,42 и 0,7 соответственно). Благодаря лабильной карбонатной связи, которая легко расщепляется под действием эстеразы, ETP-cbz является пролекарством этопозида. Разработан метод получения наноформы ETP-cbz на основе альбумина. Содержание ETP-cbz в суспензии составило 1,75 мг/мл, размер частиц – 110 ± 9 нм (ДРС), концентрация дезинтеграции – 3,0 ± 0,1 мкг/мл. Цитотоксичность наноформы ETP-cbz в отношении клеток MCF-7 и HBL-100 *in vitro* сопоставима с активностью свободного этопозида и ETP-cbz.

Заключение. Полученная наноформа пролекарства этопозида на основе альбумина, пригодная для инъекционного введения, проявила высокую цитотоксичность в отношении клеток РМЖ *in vitro* и заслуживает дальнейшего изучения для оценки возможности ее применения в химиотерапии РМЖ.

Ключевые слова: пролекарство этопозида, человеческий сывороточный альбумин, наночастицы, цитотоксичность, рак молочной железы

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. С. Ковшова, С. А. Бойко и Ю. А. Малиновская осуществляли получение и физико-химический анализ наночастиц. С. Н. Мантров разработал методику синтеза и очистки ETP-cbz и проводил анализ его структуры. Н. С. Осипова и М. А. Меркулова исследовали стабильность частиц *in vitro*. Н. И. Моисеева оценивала цитотоксическую активность лекарственных форм. С. Э. Гельперина осуществляла общее руководство проектом. Все авторы принимали участие в анализе данных и обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (проект FSSM-2022-0003).

Для цитирования: Ковшова Т. С., Бойко С. А., Меркулова М. А., Осипова Н. С., Моисеева Н. И., Малиновская Ю. А., Мантров С. Н., Гельперина С. Э. Разработка инъекционной формы 4'-О-бензилоксикарбонильного производного этопозида на основе человеческого сывороточного альбумина для химиотерапии рака молочной железы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):58–65. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-58-65>

Development of Injectable Formulation of 4'-O-benzoyloxycarbonyl-etoposide Derivative Based on Human Serum Albumin for the Chemotherapy of Breast Cancer

Tatyana S. Kovshova¹, Svetlana A. Boiko¹✉, Maria A. Merkulova¹,
Nadezhda S. Osipova¹, Natalia I. Moiseeva², Julia A. Malinovskaya¹, Sergey N. Mantrov¹,
Svetlana E. Gelperina¹

¹ Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9, Miusskaya square, Moscow, 125047, Russia

² Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 23, Kashirskoe highway, Moscow, 115478, Russia

✉ Corresponding author: Svetlana A. Boiko. E-mail: 718bsvetlana@gmail.com

ORCID: Tatyana S. Kovshova – <https://orcid.org/0000-0002-0398-4645>; Svetlana A. Boiko – <https://orcid.org/0000-0001-7793-2007>;
Maria A. Merkulova – <https://orcid.org/0000-0001-9649-1462>; Nadezhda S. Osipova – <https://orcid.org/0000-0002-2814-9064>;
Natalia I. Moiseeva – <https://orcid.org/0000-0001-6697-7154>; Julia A. Malinovskaya – <https://orcid.org/0000-0002-9771-3992>;
Sergey N. Mantrov – <https://orcid.org/0000-0002-0188-5125>; Svetlana E. Gelperina – <https://orcid.org/0000-0003-1113-6715>.

Received: 03.08.2022

Revised: 03.07.2023

Published: 25.08.2023

Abstract

Introduction. One of the promising strategies for the development of injectable formulations of poorly water-soluble drugs is the preparation of their nanosuspensions stabilized with albumin. A well-known example of the successful implementation of this technology is Abraxane® (nanoparticle albumin-bound paclitaxel). In the present study, this approach is used for the development of the injectable formulation of a hydrophobic etoposide prodrug.

Aim. Development of the injectable formulation of a novel 4'-O-benzoyloxycarbonyl derivative of etoposide (ETP-cbz) based on human serum albumin and evaluation of its cytotoxicity against breast carcinoma cells (BC).

Materials and methods. The structure of ETP-cbz was confirmed by NMR spectroscopy and elemental analysis; log P was calculated *in silico* using Molinspiration Cheminformatics. The ETP-cbz-HSA nanoparticles were prepared by high pressure homogenization. The particle size, size distribution, and disintegration concentration were evaluated by dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM). The contents of ETP-cbz and albumin in the formulation were determined by HPLC. The conversion ETP-cbz-HSA to etoposide was studied in a model medium in the presence of esterase. The cytotoxicity of ETP-cbz-HSA compared to etoposide and free ETP-cbz was assessed on BC cells (HBL-100 and MCF-7) using a colorimetric MTT assay.

Results and discussion. ETP-cbz exhibited higher hydrophobicity as compared to the etoposide (log P 2.42 vs 0.7, respectively). Due to easy cleavage of the carbonate bond in the presence of esterase, ETP-cbz can be considered an etoposide prodrug. The ETP-cbz-containing HSA nanoparticles prepared by a high-pressure homogenization technique had the particle size of 110 ± 9 nm (DLS) and a low disintegration concentration of 3.0 ± 0.1 µg/mL. The drug content was 1.75 mg/mL. The nanoformulation demonstrated high cytotoxic activity *in vitro* against MCF-7 and HBL-100 cells that was comparable to the activity of substances etoposide and ETP-cbz.

Conclusion. The obtained nanoformulation of etoposide prodrug based on albumin, suitable for injection, showed high cytotoxicity against breast cancer cells *in vitro* and deserves further study to assess the possibility of its use in breast cancer chemotherapy.

Keywords: etoposide prodrug, human serum albumin, nanoparticles, cytotoxicity, breast cancer

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Tatyana S. Kovshova, Svetlana A. Boiko and Julia A. Malinovskaya carried out the preparation and physicochemical analysis of the nanoparticles. Sergey N. Mantrov developed the method of synthesis and purification of ETP-cbz and analyzed its structure. Nadezhda S. Osipova and Maria A. Merkulova studied the stability of nanoparticles *in vitro*. Natalia I. Moiseeva evaluated the cytotoxic activity of drug formulations *in vitro*. Svetlana E. Gelperina was the scientific supervisor of this study. All authors participated in data analysis and discussion of the results.

Funding. The research was carried out within the study assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FSSM-2022-0003).

For citation: Kovshova T. S., Boiko S. A., Merkulova M. A., Osipova N. S., Moiseeva N. I., Malinovskaya Ju. A., Mantrov S. N., Gelperina S. E. Development of injectable formulation of 4'-O-benzoyloxycarbonyl-etoposide derivative based on human serum albumin for the chemotherapy of breast cancer. *Drug development & registration*. 2023;12(3):58–65. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-58-65>

ВВЕДЕНИЕ

Разработка инъекционных форм труднорастворимых в воде лекарственных веществ (ЛВ) является сложной задачей, для решения которой обычно применяют такие вспомогательные вещества, как масла,

поверхностно-активные вещества и органические растворители. Однако введение этих вспомогательных веществ часто приводит к побочным эффектам. Альтернативным подходом к получению инъекционных форм труднорастворимых веществ является получение их наносuspензий, стабилизированных

альбумином. Примером успешного применения этого подхода, позволяющего избежать применения токсичных эксципиентов, является препарат Abraxane® (nab™-paclitaxel, от *англ.* Nanoparticle albumin-bound, Celgene Corporation), одобренный FDA в 2006 г. для лечения метастатического рака молочной железы (РМЖ) [1, 2]. Наносуспензии, получаемые по nab™-технологии, представляют собой суспензии наночастиц (НЧ) гидрофобного ЛВ, стабилизированных альбумином. После внутривенного введения частицы диссоциируют с образованием растворимых комплексов «ЛВ – альбумин». Известно, что опухоли молочной железы часто отличаются повышенной экспрессией белка SPARC (кислый секретруемый белок, богатый цистеином), который может способствовать накоплению в опухоли ЛВ, связанных с альбумином [1].

Наличие в молекуле сывороточного альбумина нескольких сайтов связывания ЛВ различной природы [2] свидетельствует о возможности применения этой технологии для получения инъекционных форм других противоопухолевых агентов. Этопозид – полусинтетическое производное подофиллотоксина, ингибитор топоизомеразы II, который применяется в комбинированной химиотерапии РМЖ, а также рака яичников, мелкоклеточного рака легких, саркомы Капоши, лимфомы Ходжкина и опухолей головного мозга [3]. Этопозид обладает низкой растворимостью в воде (<0,1 мг/мл при +37 °C) [4], поэтому для получения его инъекционной формы используют высокие концентрации солюбилизаторов и сорастворителей (полисорбат-80, макрогол-300, бензиловый и этиловый спирты), способные вызвать реакции гиперчувствительности. Помимо известных примеров модификации молекулы этопозид (Etoporphos®, фосфат этопозид), могут быть использованы другие стратегии повышения растворимости, в частности получение наносуспензий [5, 6]. Этопозид обладает высокой степенью связывания с белками плазмы (97 %) и способен взаимодействовать с сайтом Садлоу III человеческого сывороточного альбумина [7]. Вместе с тем повышение гидрофобности молекулы этопозид может способствовать ее связыванию с альбумином в процессе эмульгирования и гомогенизации за счет повышения растворимости в органической фазе и в конечном итоге получению стабильной наносуспензии.

Таким образом, **целью настоящего исследования** было получение гидрофобного 4'-О-бензилоксикарбонильного производного этопозид и разработка его инъекционной формы на основе человеческого сывороточного альбумина с использованием принципов nab™-технологии, а также изучение цитотоксической активности наноформы *in vitro* на линиях клеток карциномы молочной железы MCF-7 и HBL-100.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

В работе использовали: этопозид (100 %, Qilu Antibiotics Pharmaceutical Co., Ltd., Китай); раствор человеческого сывороточного альбумина (20 %, Плазбумин®-20, Grifols Therapeutics Inc., США); этанол 96 % (EtOH), хлороформ, диметилсульфоксид (ДМСО) и тетрагидрофуран (ТГФ) (х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия); лиофилизированная эстераза печени лошади, хлорид натрия (NaCl, 99 %), бензилхлорформиат, триэтиламин (Et₃N), муравьиная кислота, диизопропилэтиламин (DIEA) и полисорбат-80 (Tween® 80) (Sigma-Aldrich Corporation, США); дигидрат двухосновного фосфата натрия, дигидрофосфат калия и гидрофосфат калия (PanReac, Испания); среда для культивирования клеток DMEM (Thermo Fisher Scientific, США); ацетонитрил (ACN) 99,9 % и метанол (MeOH) 99,8 % марки «для ВЭЖХ» (PanReac AppliChem, ITW Reagents).

Получение 4'-О-бензилоксикарбонильного производного этопозид

Гидрофобное 4'-О-бензилоксикарбонильное производное этопозид, ранее описанное в качестве промежуточного продукта при синтезе производных этопозид по методу Куна [8], было получено посредством взаимодействия этопозид с бензилхлорформиатом в ТГФ с высоким выходом реакции (93,4 %) (рисунок 1). Продукт очищали препаративной хроматографией с использованием Shimadzu LCMS-2020 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенного диодно-матричным детектором, разделение проводили на колонке YMC Pack ODS-A (250 × 20 мм, 10 мкм) в градиентном режиме элюирования: фаза А (99,9 % воды: 0,1 % муравьиной кислоты), фаза В (99,9 % ацетонитрила: 0,1 % муравьиной кислоты); 70 % А (0–2 мин), 70 → 0 % А (2–20 мин), 0 % А (20–23 мин), 0 → 70 % А (23–25 мин); скорость потока – 15 мл/мин. Время удерживания этопозид – 20 мин, время удерживания ETP-cbz – 24 мин.

Анализ структуры и растворимости ETP-cbz

Структуру ETP-cbz подтверждали данными элементного анализа с использованием CNS-2000-I (LECO Corporation, США) – %: С 61,57; Н 5,42; О 0,10 (C₃₆H₄₃O₁₃). Спектр ¹H-ЯМР получали с использованием Bruker 600 MHz Avance III (Bruker, США) – (CDCl₃, 600 МГц) δ 1,38 (д, J = 5,1 Гц, 3H), 3,30–3,36 (м, 2H), 3,44 (т, J = 8,1 Гц, 1H), 3,58–3,61 (м, 3H), 3,66–3,70 (м, 1H), 3,69 (с, 3H), 3,86 (с, 3H), 4,20 (дд, J = 4,4, 10,3 Гц, 1H), 4,30–4,34 (м, 2H), 4,50 (д, J = 7,3 Гц, 1H), 4,74 (к, J = 5,1 Гц, 1H), 4,95 (с, 1H), 5,30 (с, 2H), 5,53 (д, J = 8,1 Гц, 1H), 5,95 (с, 2H), 6,35 (с, 1H), 6,70 (с, 1H), 7,25 (с, 2H), 7,35–7,43 (м, 5H). Коэффициент распре-

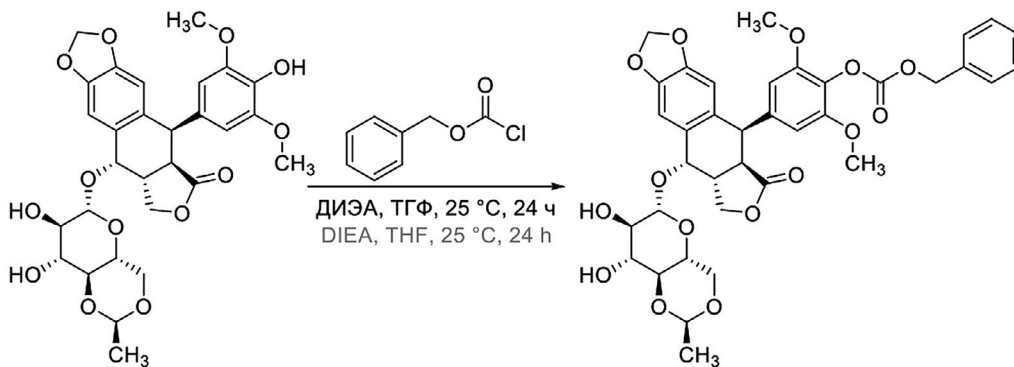


Figure 1. Synthesis of the 4'-O-benzoyloxycarbonyl derivative of etoposide (ETP-cbz)

деления н-октанол/вода ($\log P$) определяли *in silico* с использованием Molinspiration Cheminformatics (<https://www.molinspiration.com>, Словакия). Приблизительную растворимость этопозида и ЕТР-cbz в хлороформе и 96 % EtOH при +25 °С определяли визуально путем постепенного добавления небольших объемов растворителя к навеске вещества. Растворимость в воде и фосфатном буфере с добавлением 1 % Tween® 80 определяли после инкубации при +37 °С в течение 2 ч (250 об/мин, шейкер-инкубатор ES-20, BioSan, Латвия) с последующей фильтрацией (размер пор 0,22 мкм, регенерированная целлюлоза, Teknokroma Analítica S.A., Испания). Содержание в фильтрате определяли методом ВЭЖХ с использованием системы LC-20 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенной колонкой Kromasil 100-5-C18 (150 мм × 4,6 мм, 5 мкм) (AkzoNobel, Нидерланды). Для анализа использовали методику из EP 7.0 с модификациями: ПФ (А) – смесь Et₃N:безводной муравьиной кислоты:воды (1:1:998 об./об./об.), ПФ (Б) – смесь Et₃N:безводной муравьиной кислоты:ACN (1:1:998 об./об./об.); режим градиентного элюирования: 75 % А (0–7 мин), 75 → 27 % А (7–23 мин), 27 → 75 % А (23–25 мин), 75 % А (25–40 мин); температура колонки +40 °С; скорость – 1 мл/мин; объем инъекции – 10 мкл, длина волны – 285 нм. Для расчета содержания ЕТР-cbz (время удерживания – 23 мин) использовали линейную калибровочную кривую с коэффициентом наклона 2879,6 ($R^2 > 0,99$). Для расчета содержания этопозида (время удерживания – 11 мин) использовали линейную калибровочную кривую с коэффициентом наклона 4007,8 ($R^2 > 0,99$); $n = 3$.

Получение наночастиц ETP-cbz-HSA

Наночастицы ETP-cbz, стабилизированные человеческим сывороточным альбумином (ETP-cbz-HSA), были получены методом гомогенизации под давлением с последующим удалением растворителя. Навеску ETP-cbz (60 мг) растворяли в смеси 1,1 мл хлороформа и 0,1 мл 96 % EtOH для получения органи-

ческой фазы (о), которую смешивали с охлажденным до 13–14 °С 1 % водным раствором альбумина (w), приготовленным путем разведения Плазбумина®-20, при этом соотношение ЕТР-cbz и альбумина составляло 1:10 (в/в); соотношение объемов водной (w) и органической фаз (о) – 49:1. Смесь гомогенизировали, вначале используя роторный смеситель с высоким усилием сдвига Ultra-Turrax T18 basic (IKA, Германия), а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics International Corporation, США) при 2068 бар (30 000 psi) в течение 3 мин 45 с при охлаждении. После удаления остаточного органического растворителя под вакуумом полученные суспензии фильтровали через фильтр 0,2 мкм, разливали во флаконы по 1 мл и лиофилизировали (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия); образцы хранили в холодильнике при температуре +4–5 °С.

Изучение физико-химических параметров НЧ

Средний гидродинамический диаметр частиц (ZaveD), индекс полидисперсности (PDI) и распределение по размерам (Volume, %) определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) при разведении НЧ в 0,9%-м растворе NaCl (0,1 мг/мл по ETP-cbz), ζ -потенциал поверхности НЧ – методом электрофоретического рассеивания света при разведении НЧ в воде Milli-Q (1 мг/мл по ETP-cbz) (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Великобритания) (угол 173°, +25 °C, $n = 3$). Концентрацию дезинтеграции частиц определяли методом ДРС по появлению фракции 7–10 нм (Volume) после серийного разведения наносuspension в 0,9%-м растворе NaCl при +25 °C. Размер и морфологию НЧ оценивали также при помощи атомно-силовой микроскопии (ACM) (NTEGRA Prima, зонд NSG01 DLC).

Содержание ETP-cbz в НЧ определяли после ресуспендирования лиофилизата в MeOH с последующим отделением альбумина центрифугированием

(15 000 g; 10 мин) с использованием 5804R (Eppendorf, Германия), определяли методом ВЭЖХ, как описано выше; $n = 3$. Для определения содержания альбумина лиофилизат восстанавливали 0,9%-м раствором NaCl, разбавляли в 20 раз и анализировали методом ВЭЖХ, разделение проводили на колонке TSKgel® G3000SW_{XL} (300 × 7,8 мм, 5 мкм) (Tosoh Bioscience, Япония) в изократическом режиме элюирования: ПФ – 0,1 М раствора гидрофосфата калия (pH = 7); скорость – 1 мл/мин; объем инъекции – 10 мкл; температура колонки – +25 °C, длина волны – 228 нм. Для расчета содержания альбумина использовали линейную калибровочную кривую с коэффициентом наклона 3085999 ($R^2 > 0,99$); $n = 3$.

Изучение высвобождения этопозидов из ETP-cbz НЧ в модельной среде

Для подтверждения превращения ETP-cbz в составе наносuspензии на основе альбумина в этопозид наночастицы инкубировали в модельной среде (0,05 М фосфатный буфер при pH 7,4 с добавлением 1 % Tween® 80) в концентрации 0,1 мг/мл (ETP-cbz), не содержащей или содержащей эстеразу при молярном соотношении 1:4, инкубировали при +37 °C, 200 об/мин (шейкер-инкубатор ES-20, BioSan, Латвия). Через установленные интервалы (0, 2, 4 и 24 ч) отбирали 3 мл суспензии (без замены среды), центрифугировали (48 254 g, 30 мин, +18 °C) с использованием ультрацентрифуги Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, Inc., США), супернатант лиофилизировали, а затем анализировали содержание этопозидов и ETP-cbz методом ВЭЖХ, как описано выше. Конверсию ETP-cbz в этопозид (%) рассчитывали как отношение количества этопозидов (моль) в момент времени (t) и первоначального ($t = 0$) количества ETP-cbz (моль):

$$\text{Конверсия ETP-cbz} \rightarrow \text{ETP}(\%) = \frac{\frac{m_{\text{ETP}(t)}}{588,9}}{\frac{m_{\text{ETP-cbz}(t=0)}}{722}} \cdot 100 \%,$$

где $m_{\text{ETP}(t)}$ – содержание этопозидов в суспензии в момент времени t [мг]; $m_{\text{ETP-cbz}(t=0)}$ – содержание производного этопозидов в суспензии в начальный момент времени [мг]; молярные массы этопозидов и ETP-cbz – 588,9 и 722 г/моль соответственно.

Исследование цитотоксической активности in vitro (MTT-тест)

Сравнительное изучение цитотоксической активности ETP-cbz-HSA НЧ и этопозидов/ETP-cbz в свободном виде выполняли с помощью МТТ-теста. МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) (Sigma-Aldrich, США) использовали в качестве колориметрического субстрата для измерения жизнеспособности клеток. Клетки карциномы

молочной железы человека HBL-100 и MCF-7 высаживали в 96-луночные планшеты (Corning, США) по 10 тыс. клеток в лунку в 90 мкл среды DMEM с добавлением 10%-й фетальной телячьей сыворотки за 24 ч до начала эксперимента. Лиофилизат НЧ ресуспендировали 0,9%-м раствором NaCl, субстанции этопозидов и ETP-cbz растворяли в ДМСО (1 мг/мл), далее разбавляли все полученные образцы средой с добавлением сыворотки и вносили образцы в объеме 10 мкл к клеткам для достижения концентраций в диапазоне от 0,1 до 12,0 мкМ. В контрольные лунки добавляли 10 мкл среды. Клетки культивировали с соединениями в течение 72 ч, затем добавляли МТТ (5 мг/мл) (20 мкл/лунку). Через 3 ч инкубации среду с соединениями удаляли, а осадок кристаллов растворяли в 60 мкл ДМСО. Оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 540 нм. Величину IC_{50} определяли графически.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием GraphPad Prism 9.0. Статистическую значимость оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни и дисперсионного анализа (ANOVA). Для оценки цитотоксичности было проведено три независимых эксперимента. Полученные результаты представлены как средние значения ± стандартное отклонение (sd) с указанием числа параллельных измерений (n).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этерификация полярных гидроксильных (фенильных) групп лекарственных веществ (ЛВ) бензиловым эфиром является успешной стратегией для увеличения их липофильности и клеточной проницаемости [9]. 4'-О-бензилоксикарбонил-этопозид содержит карбонатную связь (рисунок 1), которая в условиях *in vivo* подвергается ферментативному гидролизу под действием эстеразы, обеспечивая быстрое высвобождение ЛВ. Структура ETP-cbz подтверждена методом ЯМР: в спектре ¹H-ЯМР помимо сдвигов, характерных для протонов этопозидов, присутствуют сдвиги, характерные для протонов бензильной группы: 5,30 (с, 2H) и 7,35–7,43 (м, 5H).

По сравнению с этопозидом ETP-cbz отличается большей гидрофобностью (рассчитанные *in silico* значения log P составили 0,70 и 2,42 соответственно), лучше растворим в органических растворителях (96 % EtOH, хлороформ) и менее растворим в водных средах (таблица 1). При добавлении 1 % Tween® 80 к фосфатному буферному раствору (pH = 7,4) растворимость ETP-cbz повышается до ~0,9 мг/мл, что позволяет использовать данную среду в качестве модельной в экспериментах *in vitro*.

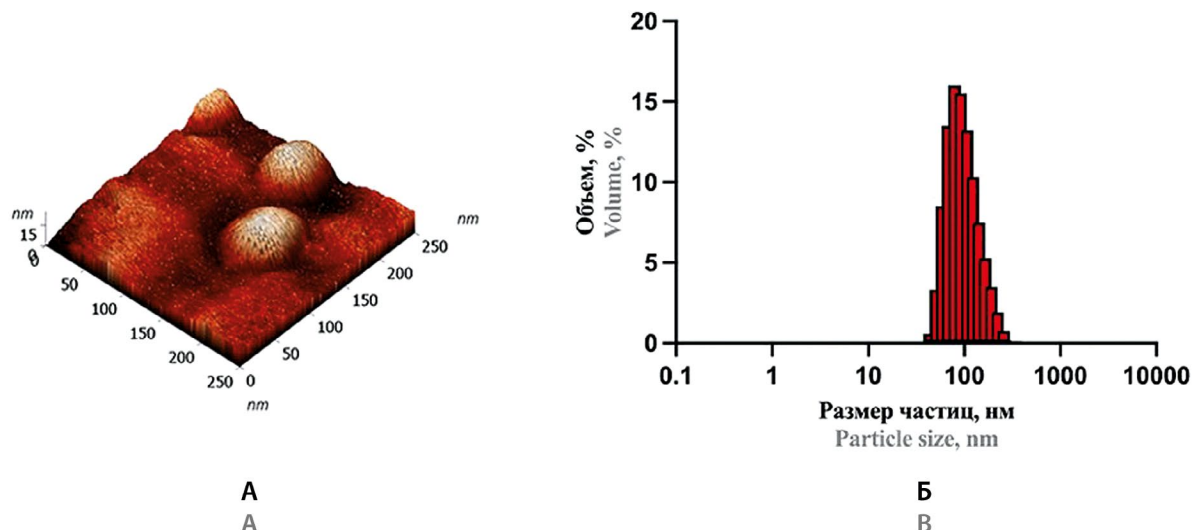


Рисунок 2. Размеры наночастиц

А – микрофотография наночастиц ETP-cbz-HSA (атомно-силовой микроскоп NTEGRA Prima, зонд NSG01 DLC, NT-MDT Spectrum Instruments, Россия), разбавление в 10 раз; Б – объемное (Volume) распределение частиц по размерам (метод DLS, анализатор Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Великобритания), разбавление в 50 раз

Figure 2. Sizes of nanoparticles

А – micrograph of ETP-cbz-HSA nanoparticles (NTEGRA Prima atomic force microscope, NSG01 DLC cantilever, NT-MDT Spectrum Instruments, Russia), 10-fold dilution; Б – volumetric (Vol) particle size distribution (DLS method, Zetasizer Nano ZS analyzer, Malvern Instruments Ltd., UK), 50-fold dilution

Таблица 1. Растворимость этопозид и Etp-cbz в органических растворителях и водных растворах (репрезентативные данные)

Table 1. Solubility of etoposide and its derivate in organic solvents and water solutions (representative data)

Растворитель Solvent	96 % Этанол 96 % Ethanol	Хлороформ Chloroform	Вода Water	0,05 М фосфатный буфер + 1 % Tween® 80 0.05 M phosphate buffer + 1 % Tween® 80
Этопозид Etoposide	2,0	5,8	0,2	0,206
ETP-cbz	19,7	351,0	~0,003	0,876

Водосовместимую форму получали в водно-органической среде методом гомогенизации под давлением ETP-cbz в присутствии альбумина с последующим удалением растворителя (принцип nab™-технологии, описанный в [1,10]). Полученная фор-

ма представляет собой стабилизированную альбумином наносuspension ETP-cbz со средним размером частиц 110 ± 9 нм, низким индексом полидисперсности $0,114 \pm 0,012$ и отрицательным ζ -потенциалом поверхности (таблица 2). Размеры НЧ, определенные с помощью АСМ, были значительно меньше и составляли в среднем 70 ± 15 нм (рисунок 2, А), что объясняется вкладом гидратной оболочки в размер, определенный методом ДРС. Распределение частиц по размерам (основной пик по объему) при разведении до концентрации ЛВ 0,1 мг/мл представлен на рисунке 2, Б. Наночастицы ETP-cbz-HSA проявили высокую стабильность и при разбавлении 0,9%-м раствором NaCl диссоциировали до растворимых комплексов альбумин-ETP-cbz, по размеру близких к нативному альбумину, только при ~600-кратном разбавлении исходной суспензии (до концентрации $3,0 \pm 0,1$ мкг/мл). Стоит отметить, концентрация дезинтеграции ETP-cbz-HSA НЧ была значительно ниже известных значений для nab™-паклитаксела

Таблица 2. Физико-химические параметры наночастиц ETP-cbz-HSA ($n = 3$, среднее $\pm$ sd)

Table 2. Physicochemical parameters of the ETP-cbz-HSA nanoparticles ($n = 3$, mean $\pm$ sd)

Содержание ETP-cbz, мг/мл ETP-cbz content, mg/mL	Содержание альбумина, мг/мл Albumin content, mg/mL	Средний размер, нм Average size, nm	Индекс полидисперсности (PDI) Polydispersity index (PDI)	ζ -потенциал, мВ ζ -potential, mV	Концентрация дезинтеграции, мкг/мл Disintegration concentration, μ g/mL
$1,75 \pm 0,02$	$20,55 \pm 1,48$	110 ± 9	$0,114 \pm 0,012$	$-21,4 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$

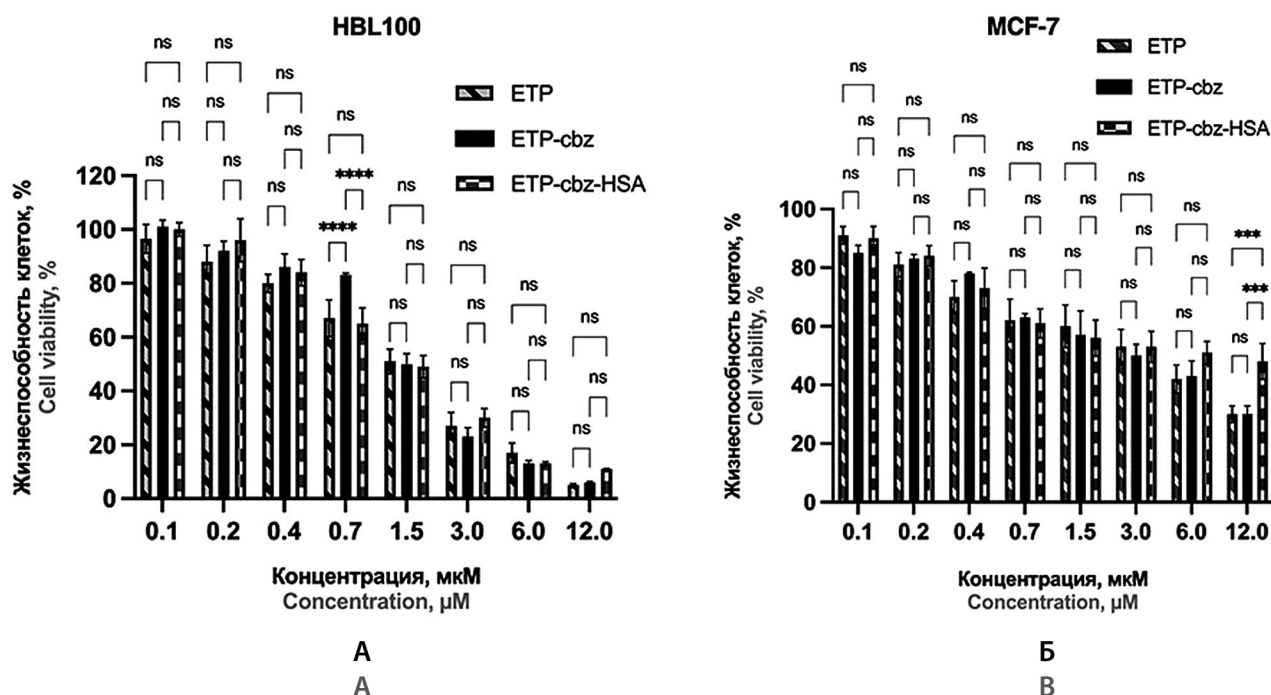


Рисунок 3. Анализ жизнеспособности клеток HBL-100 (А) и MCF-7 (Б) после 72 ч инкубации с наночастицами ETP-cbz-HSA, а также этопозидом и ETP-cbz в свободном виде. Концентрация в пересчете на ETP-cbz/этопозид (среднее значение $\pm$ sd; $n = 3$); **** – $p < 0,0005$, *** – $p < 0,001$, ns – $p > 0,05$

Figure 3. Cell viability assay for HBL-100 (A) и MCF-7 (B) cells after 72 h of incubation with different concentrations of ETP-cbz-HSA nanoparticles and free etoposide / ETP-cbz. Concentrations are indicated corresponding to free ETP-cbz/etoposide (mean $\pm$ sd; $n = 3$); **** – $p < 0.0005$, *** – $p < 0.001$, ns – $p > 0.05$

(AbraXane®) [1,9]. В отличие от ETP-cbz этопозид не образовывал наносуспензию с молекулами человеческого сывороточного альбумина в описанных выше условиях, что, скорее всего, объясняется его более низкой липофильностью. Деградация ETP-cbz в составе НЧ в модельной среде (1 % Tween® 80 в фосфатном буфере) происходит только в присутствии эстеразы: конверсия составила около 76 % за 24 ч (при концентрации ETP-cbz 100 мкг/мл). Кроме того, отмечено, что в момент разведения 70 % ETP-cbz сразу переходит в раствор в комплексе с альбумином, хотя по данным ДРС полного распада НЧ при этом еще не происходит.

Цитотоксичность полученной наноразмерной формы ETP-cbz в сравнении с этопозидом и ETP-cbz в свободном виде исследована *in vitro* на культурах клеток РМЖ с разной степенью злокачественности (HBL-100 и MCF-7) (рисунок 3, таблица 3). Как видно из приведенных данных, статистически значимых различий в цитотоксичности (IC_{50}) этопозид и ETP-cbz в составе НЧ и в свободном виде на клетках HBL-100 ($p < 0,05$) не выявлено: в среднем $IC_{50} \approx 1,5$ мкМ (рисунок 3, А). Аналогичные результаты получены и на культуре клеток MCF-7. В случае MCF-7 цитотоксичность этопозид соответствовала литературным данным ($\approx 3-4$ мкМ) [11], а суспензия наночастиц ETP-

cbz-HSA и субстанция ETP-cbz (суспензия в ДМСО) показали близкие уровни цитотоксичности (рисунок 3, Б).

Таблица 3. Цитотоксическая активность наночастиц ETP-cbz-HSA и субстанций этопозид и ETP-cbz на культурах РМЖ после 72 ч инкубации (IC_{50} , $n = 3$, среднее $\pm$ sd)

Table 3. Cytotoxic activity of the ETP-cbz-HSA nanoparticles and substances of etoposide and ETP-cbz on breast cancer cultures after 72 h of incubation (IC_{50} , $n = 3$, mean $\pm$ sd)

Культура клеток Cell culture		ETP-cbz-HSA	ETP-cbz	Этопозид Etoposide
IC_{50} мкМ	HBL-100	1,42 $\pm$ 0,5	1,55 $\pm$ 0,5	1,65 $\pm$ 0,8
IC_{50} μМ	MCF-7	7,90 $\pm$ 1,2	2,93 $\pm$ 0,7	3,86 $\pm$ 1,0

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученное гидрофобное 4'-О-бензилоксикарбонильное производное этопозид (ETP-cbz), обладающее благодаря лабильной карбонатной связи свойством пролекарства, способно образовывать стабильную наносуспензию с человеческим сывороточным альбумином с размером частиц 110 ± 9 нм. Наночастицы ETP-cbz проявила высокую цитотоксическую активность в отношении клеток РМЖ HBL-100 и MCF-7, сходную с активностью этопозид, что по-

зволяет судить об эффективности конверсии ЕТР-cbz в культуральной среде и проникновению ее комплексов с альбумином в клетки. Таким образом, использование пролекарства этопозид ЕТР-cbz в форме наносuspензии, стабилизированной альбумином, позволяет создать потенциально безопасную форму этопозид, пригодную для инъекционного введения и заслуживающую дальнейшего изучения для терапии РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Desai N. Nanoparticle albumin bound (nab) technology: targeting tumors through the endothelial gp60 receptor and SPARC. *Nano-medicine: nanotechnology, biology, and medicine*. 2007;4(3):339. DOI: 10.1016/j.nano.2007.10.021.
- Cho H., Jeon S. I., Ahn C.-H., Shim M. K., Kim K. Emerging Albumin-Binding Anticancer Drugs for Tumor-Targeted Drug Delivery: Current Understandings and Clinical Translation. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):728. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040728.
- Meresse P., Dechaux E., Monneret C., Bertounesque E. Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11(18):2443–2466. DOI: 10.2174/0929867043364531.
- Alsali A., Ayon N. J., Coulibaly F., Alshamrani M., Al-Nafisah A., Youan B.-B. C. Enhancing Etoposide Aqueous Solubility and Anticancer Activity with L-Arginine. *ASSAY and Drug Development Technologies*. 2021;19(8):508–525. DOI: 10.1089/adt.2021.085.
- Ahire E., Thakkar S., Darshanwad M., Misra M. Parenteral nano-suspensions: a brief review from solubility enhancement to more novel and specific applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2018;8(5):733–755. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.07.011.
- Wang Z., Li Z., Zhang D., Miao L., Huang G. Development of etoposide-loaded bovine serum albumin nanosuspensions for parenteral delivery. *Drug Delivery*. 2015;22(1):79–85. DOI: 10.3109/10717544.2013.871600.
- Manjushree M., Revanasiddappa H. D. Evaluation of binding mode between anticancer drug etoposide and human serum albumin by numerous spectrometric techniques and molecular docking. *Chemical Physics*. 2020;530:110593. DOI: 10.1016/j.chemphys.2019.110593.
- Ohnuma T., Obata R., Nishiyama Y., Yamasaki T., Kamei H., Naito T., Oki T. Preparation and Antitumor Activity of 2"-O-, 3"-O- and 2", 3"-Di-O-substituted Derivatives of Etoposide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1992;40(7):1783–1788. DOI: 10.1248/cpb.40.1783.
- Leu Y.-L., Chen C.-S., Wu Y.-J., Chern J.-W. Benzyl ether-linked glucuronide derivative of 10-hydroxycamptothecin designed for selective camptothecin-based anticancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(6):1740–1746. DOI: 10.1021/jm701151c.
- Fu Q., Sun J., Zhang W., Sui X., Yan Z., He Z. Nanoparticle albumin-bound (NAB) technology is a promising method for anti-cancer drug delivery. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2009;4(3):262–272. DOI: 10.2174/157489209789206869.
- Mahidol C., Prawat H., Sangpetsiripan S., Ruchirawat S. Bioactive scalaranes from the Thai sponge *Hyrtios gumminae*. *Journal of Natural Products*. 2009;72(10):1870–1874. DOI: 10.1021/np900267v.