

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-81-88>
УДК 615.014



Оригинальная статья / Research article

Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в составе конъюгата полимерных частиц с белковой векторной молекулой

М. Б. Сокол^{1,2*}, Н. Г. Яббаров^{1,2}, М. Р. Моллаева^{1,2}, М. В. Чиркина (Фомичева)^{1,2}, В. Ю. Балабаньян³, Е. Д. Никольская^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН), 119334, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

² ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (ОАО «ВНЦМДЛ»), 117638, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

*Контактное лицо: Сокол Мария Борисовна. E-mail: mariyabsokol@gmail.com

ORCID: М. Б. Сокол – <https://orcid.org/0000-0002-1976-1972>; Н. Г. Яббаров – <https://orcid.org/0000-0003-3361-9136>; М. Р. Моллаева – <https://orcid.org/0000-0002-9999-4652>;

М. В. Чиркина (Фомичева) – <https://orcid.org/0000-0001-6061-4803>; В. Ю. Балабаньян – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>;

Е. Д. Никольская – <https://orcid.org/0000-0002-1931-3117>.

Статья поступила: 29.06.2021

Статья принята в печать: 30.09.2021

Статья опубликована: 25.11.2021

Резюме

Введение. Применение противоопухолевого препарата паклитаксела ограничено из-за его высокой системной токсичности и липофильности, существенно лимитирующей создание парентеральных форм на основе субстанции паклитаксела. Предложена новая полимерная композиция паклитаксела, обеспечивающая направленный транспорт препарата в опухолевые клетки и повышающая профиль его безопасности.

Цель. Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в виде конъюгата частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с третьим доменом альфа-фетопротеина.

Материалы и методы. Объектом данного исследования являются наночастицы, содержащие паклитаксел, на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, поверхность которых модифицирована векторной молекулой – рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротеина. Наночастицы получали методами одинарного эмульгирования и преципитацией. Последующую конъюгацию с белковой молекулой проводили карбодимидным методом. Анализ полученных наночастиц проводили с помощью динамического и электрофоретического светорассеяния, высокоэффективной жидкостной хроматографии, метода диализной мембраны.

Результаты и обсуждение. Разработан метод получения наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с паклитакселом, оптимизирована конъюгация полученных наночастиц с белковой векторной молекулой при варьировании широкого диапазона условий. Полученные наночастицы обладали средним диаметром 280 ± 12 нм. Эффективность конъюгации составила 95 %. Высвобождение паклитаксела из полимерной матрицы в среде 0,01 М фосфатно-солевого буфера (рН 7,4) составило 65 % за 220 ч.

Заключение. Предложен метод получения и приведено обоснование состава оригинальной наноразмерной формы паклитаксела на основе конъюгата частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот с третьим доменом альфа-фетопротеина. Показана возможность пролонгированного высвобождения паклитаксела из полимерной матрицы.

Ключевые слова: наночастицы, PLGA, паклитаксел, контролируемое высвобождение, альфа-фетопротеин

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

Вклад авторов. М. Б. Сокол, М. Р. Моллаева, Е. Д. Никольская и В. Ю. Балабаньян разрабатывали дизайн исследования, получение и анализ данных. Н. Г. Яббаров и М. В. Чиркина (Фомичева) проводили обзор публикаций. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и подготовке рукописи.

Для цитирования: Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Чиркина (Фомичева) М. В., Балабаньян В. Ю., Никольская Е. Д. Разработка состава и технологии получения наноразмерной формы паклитаксела в составе конъюгата полимерных частиц с белковой векторной молекулой. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):81–88. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-81-88>

Development of the Composition and Technology for Obtaining Paclitaxel Nanoscale Formulation Consisting of a Conjugate of Polymer Particles with a Protein Vector Molecule

Maria B. Sokol^{1,2*}, Nikita G. Yabbarov^{1,2}, Mariia R. Mollaeva^{1,2}, Margarita V. Chirkina (Fomicheva)^{1,2}, Vadim Yu. Balaban'yan³, Elena D. Nikolskaya^{1,2}

¹ N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS (IBCP RAS), 4, Kosygina str., Moscow, 119334, Russia

² JSC "RCMDT", 8, Simferopol'skiy Boulevard, Moscow, 117638, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

*Corresponding author: Maria B. Sokol. E-mail: mariyabsokol@gmail.com

ORCID: Maria B. Sokol – <https://orcid.org/0000-0002-1976-1972>; Nikita G. Yabbarov – <https://orcid.org/0000-0003-3361-9136>; Mariia R. Mollaeva – <https://orcid.org/0000-0002-9999-4652>;

Margarita V. Chirkina (Fomicheva) – <https://orcid.org/0000-0001-6061-4803>; Vadim Yu. Balaban'yan – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>;

Elena D. Nikolskaya – <https://orcid.org/0000-0002-1931-3117>.

Received: 29.06.2021

Revised: 30.09.2021

Published: 25.11.2021

© Сокол М. Б., Яббаров Н. Г., Моллаева М. Р., Чиркина (Фомичева) М. В., Балабаньян В. Ю., Никольская Е. Д., 2021

© Sokol M. B., Yabbarov N. G., Mollaeva M. R., Chirkina (Fomicheva) M. V., Balaban'yan V. Yu., Nikolskaya E. D., 2021

Abstract

Introduction. The use of the anticancer drug paclitaxel is limited due to its high toxicity and lipophilicity. A new polymer composition of paclitaxel has been proposed, which provides targeted transport of the drug into tumor cells and improves its safety.

Aim. Method development for preparation of a novel paclitaxel formulation consisting of a conjugate of PLGA nanoparticles with the third domain of alpha-fetoprotein.

Materials and methods. The object of this study is paclitaxel-loaded nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids, the surface of which is modified with a vector molecule – the recombinant third domain of alpha-fetoprotein. Nanoparticles were obtained by single emulsification method and precipitation. Conjugation with a protein molecule was performed by the carbodiimide method. The analysis of the obtained nanoparticles was carried out using dynamic and electrophoretic light scattering, high performance liquid chromatography, dialysis membrane method.

Results and discussion. Synthesis of paclitaxel-loaded nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids and its conjugation optimization under varying a wide range of conditions have been carried out. The resulting conjugate had an average diameter of 280 ± 12 nm. The conjugation efficiency was 95 %. The release of paclitaxel from the polymer matrix in the release medium was 65 % in 220 h.

Conclusions. A method of obtaining and substantiating the composition of the original nanosized form of paclitaxel is proposed. The possibility of prolonged release of paclitaxel from the polymer matrix has been shown.

Keywords: nanoparticles, PLGA, paclitaxel, controlled release, alpha-fetoprotein

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. Maria B. Sokol, Mariia R. Mollaeva, Elena D. Nikolskaya and Vadim Yu. Balaban'yan carried out the study design, data acquisition and analysis. Nikita G. Yabbarov and Margarita V. Chirkina (Fomicheva) reviewed publications. All authors took part in the discussion of the results and preparation of the manuscript.

For citation: Sokol M. B., Yabbarov N. G., Mollaeva M. R., Chirkina (Fomicheva) M. V., Balaban'yan V. Yu., Nikolskaya E. D. Development of the composition and technology for obtaining paclitaxel nanoscale formulation consisting of a conjugate of polymer particles with a protein vector molecule. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4):81–88. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-81-88>

ВВЕДЕНИЕ

Паклитаксел (Ptx) является химиотерапевтическим агентом, применяемым для лечения немелкоклеточного рака легких, рака яичников, рака молочной железы [1, 2]. Практическое использование Ptx затруднено из-за его высокой липофильности, в связи с чем в состав лекарственной формы Ptx для клинического применения входит солюбилизатор – Cremophor® EL. Использование последнего сопряжено с развитием реакций гиперчувствительности и возникновением нейтропении [2].

Вторая вышедшая на фармацевтический рынок лекарственная форма паклитаксела – Abрахане®. Этот препарат представляет собой наноразмерные агрегаты альбумина с нековалентно связанным Ptx [3]. Клинические исследования Abрахане® показали, что отсутствие Cremophor® EL снижает токсичность препарата и позволяет вводить дозу выше на 49 % без премедикации кортикостероидами [4]. В случае применения Abрахане® доставка Ptx в опухолевые ткани неспецифична и осуществляется за счет пассивного транспорта частиц альбумина, обусловленного эффектом повешенной проницаемости и удерживания [5].

В настоящее время сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) широко применяется для получения систем доставки лекарственных веществ. PLGA является биосовместимым и биodeградируемым полимером, одобренным регуляторными органами США

и Европы для парентерального применения [6]. Получение адресных систем доставки на основе PLGA с векторными молекулами является перспективной стратегией увеличения специфического действия лекарственных препаратов. В последние десятилетия широко изучается, в том числе и в нашей лаборатории [7], возможность использования рекомбинантного альфа-фетопротейна (AFP) и его функциональных фрагментов в качестве векторной молекулы для адресной доставки противоопухолевых препаратов. AFP является известным онкомаркером, экспрессия которого избирательно повышена в опухолевых клетках и практически отсутствует у нормальных клеток [8].

Ранее в нашей лаборатории была показана возможность получения наночастиц PLGA с паклитакселом и дальнейшей модификации их поверхности рекомбинантным третьим доменом AFP человека (rAFP3d) [9, 10]. В проведенном исследовании конъюгат адресного действия получали, образуя ковалентную связь между аминокислотными группами белка и карбоксильными группами модифицированного ангидридом янтарной кислоты поливинилового спирта (PVA), входящего в состав лиофилизата полученных наночастиц. Несмотря на доказанную клеточную интернализацию, уровень эндоцитоза разработанной системы и селективной доставки в клетки-мишени *in vivo* могут быть ограничены из-за десорбции модифицированного PVA с поверхности наночастиц [11].

В настоящей работе предложен и оптимизирован карбодимидный метод [12] получения конъюгата адресного действия с помощью модификации карбоксильных групп PLGA, находящихся на поверхности наночастиц. Таким образом, удалось достичь постоянного количества связанного с наночастицами белка в полученной адресной системе доставки паклитаксела. Была доказана противоопухолевая эффективность и селективность действия полученного конъюгата, что подтверждает эффективность разработанной и оптимизированной технологии [13].

Цель исследования – разработка состава и технологии получения наноразмерной формы Ptx в виде конъюгата частиц PLGA с третьим доменом альфа-фетопротейна (rAFP3d-NP).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение наночастиц

Оптимизацию процесса получения наночастиц PLGA, нагруженных паклитакселом (NPs), проводили, анализируя такие параметры, как размер, дзета-потенциал, общее содержание (DL) и индекс полидисперсности (PDI) и варьируя метод получения наночастиц, тип используемого сополимера PLGA, соотношение PLGA:Ptx, соотношение объема органической и водной фаз (O:W), концентрацию стабилизатора эмульсии (PVA) и органический растворитель.

NPs получали методом одинарного эмульгирования или преципитации, как описано в опубликованных ранее работах авторов [14, 15]. Первичную эмульсию получали путем эмульгирования органической фазы, представляющей собой раствор паклитаксела (LC Laboratories, США) и PLGA (Purasorb®, D,L-лактид/гликолид = 50:50 моль/моль, характеристическая вязкость 0,2 и 0,4 см³/г, молекулярная масса 17–21 кДа; Corbion Biomedicals, Нидерланды) в органическом растворителе [дихлорметане (DCM), трихлорметане (TCM), смеси трихлорметан/ацетон (TCM/ACTN) с соотношением объемов 7:3; х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия], с водным раствором (0,5, 1 или 2%) поливинилового спирта (степень гидролиза 87–90 %, Sigma-Aldrich, США) при помощи УЗ-гомогенизатора (Labsonic U.B. Braun, Германия). Для получения NPs использовали соотношения PLGA:Ptx, составляющие 1:5 или 1:10; соотношение O:W составляло 1:3, 1:5, 1:10 или 1:20. Органический растворитель удаляли под вакуумом, полученную наносuspension центрифугировали при +4 °C и 16 000 g в течение 30 мин. Ресуспендированный в 10 мл дистиллированной воды осадок фильтровали через стеклянный фильтр, замораживали с добавлением D-маннитола (10 масс. %, Sigma-Aldrich, США) в качестве криопротектора и лиофилизировали в течение 24 ч (Alpha 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия). Образцы хранили в холодильнике без доступа света при температуре +4 °C.

Размер полученных наночастиц и дзета-потенциал определяли методами динамического и электрофоретического рассеяния света, соответственно, на

приборе Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 instrument (Malvern Instruments Ltd., Великобритания).

Общее содержание паклитаксела в наночастицах определяли с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), как было описано ранее [16].

Получение rAFP3d-NP

Конъюгат оптимизированных NPs с rAFP3d был получен с помощью карбодимидного метода [13]. Расчет мольной концентрации PLGA проводили, исходя из концентрации карбоксильных групп 6 мг KOH/г, указанной в спецификации. Согласно [12], значение mEq/g = μmol/mg, что позволяет определить количество карбоксильных групп в навеске NPs (n) по формуле:

$$n = m(\text{NPs}) \times w(\text{PLGA}) \times \text{IA} \times M(\text{KOH})^{-1} \times 100^{-1},$$

где m(NPs) – масса навески наночастиц, мг; w(PLGA) – массовая доля PLGA в навеске частиц, %; IA – кислотное число, мг KOH/г; M(KOH) – молярная масса эквивалента KOH, г/моль.

20 мг предварительно отмытых NPs ресуспендировали в 1 мл 0,01 M PBS и инкубировали с 1,5 мкмоль (7,5 мкмоль, 15 мкмоль или 30 мкмоль) 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC, Fluka, Германия) и 1,5 мкмоль (7,5 мкмоль, 15 мкмоль или 30 мкмоль) N-гидроксисукцинимидом (NHS, Merck, Германия) в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее добавляли 1,5 мкмоль (7,5 мкмоль, 15 мкмоль или 30 мкмоль) 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich, США) и перемешивали в течение 10 мин. В реакционную смесь добавляли растворы 0,15 мкмоль (0,30 мкмоль, 0,45 мкмоль, 0,75 мкмоль, 1,5 мкмоль или 7,5 мкмоль) rAFP3d в 0,01 M PBS (pH 7,4) и доводили pH раствора до 8,5 с помощью 10 M NaOH (Merck, Германия). rAFP3d был получен ранее в лаборатории ОАО «ВНЦМДЛ» [17]. После 30 мин инкубирования к полученной реакционной смеси добавляли 1,5 мкмоль этаноламина (Fluka, Германия) для остановки реакции, и перемешивали реакционную смесь еще 10 мин. Очистку и выделение целевого продукта реакции – rAFP3d-NP проводили с помощью гель-фильтрации на сорбенте Superose 12 (GE Healthcare, США), элюируя 0,1 M NH₄HCO₃ (Sigma-Aldrich, США). Для лиофилизации очищенной целевой фракции rAFP3d-NP подбирали тип и концентрацию криопротектора, добавляя сахарозу, глюкозу или D-маннитол (5 или 10 масс. %; х.ч. ООО «АО РЕАХИМ», Россия). Образцы лиофилизировали в течение 24 ч (Alpha 2-4, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Германия) и хранили при +4 °C.

Эффективность конъюгации (ЭК) определяли по формуле:

$$\text{ЭК} = (m_i/m_f) \times 100 \%,$$

где m_i – внесенная в реакционную смесь масса rAFP3d, мг; m_f – конечная масса rAFP3d в лиофилизированном продукте (конъюгат rAFP3d-NP), мг.

Исследование кинетики высвобождения паклитаксела

Для изучения скорости высвобождения паклитаксела из rAFP3d-NP использовали метод равновесного диализа через полупроницаемую мембрану. Около 10 мг rAFP3d-NP (точная навеска) наносили на мембрану (регенерированная целлюлоза, MWCO 10 кДа), неподвижно закрепленную в чаше для диализа Slide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Devices (Thermo Fisher Scientific, США). Чашу с навеской опускали на 2–3 мм в стакан с диализной средой (0,01 M PBS, pH 7,4) объемом 1,7 л. Температура инкубации составила 37 °C, что соответствует температуре кровяного русла человека. Через определенные промежутки времени отбирали пробу диализата и сразу же восполняли свежей средой до первоначального объема. Количественное содержание паклитаксела в диализате определяли с помощью ВЭЖХ [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка метода получения и обоснование состава наночастиц

С целью оптимизации процесса получения наночастиц оценивали влияние различных технологических параметров на размер, PDI, дзета-потенциал и DL паклитаксела в частицах (рисунки 1, 2).

Для получения частиц были выбраны стандартные методы инкапсулирования гидрофобных веществ – нанопреципитация и прямое эмульгирование [18].

Для получения наночастиц был выбран биodeградируемый и биосовместимый сополимер D,L-молочной и гликолевой кислот (PLGA). С целью дальнейшей функционализации поверхности наночастиц оптимизацию процесса получения проводили с использованием полимеров с терминальной карбоксильной группой. Ранее нами было показано, что использование полимера с соотношением лактидных и гликолид-

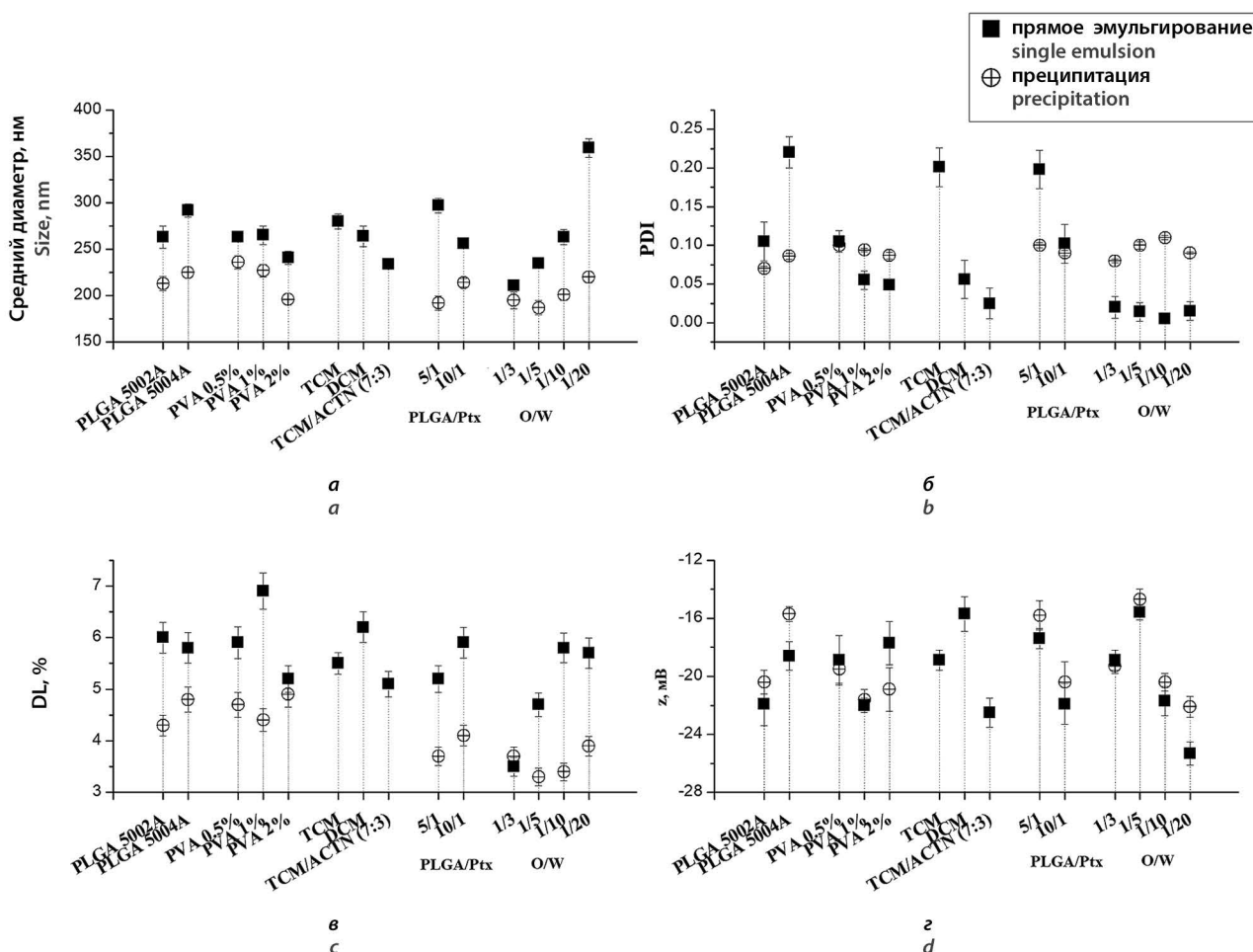


Рисунок 1. Подбор условий процесса получения наночастиц с паклитакселом методами прямого эмульгирования и преципитации (n = 3).

Зависимости: а – среднего диаметра, нм; б – индекса полидисперсности (PDI); в – общего содержания (DL, %); г – дзета-потенциала (z, мВ) от условий получения. PVA – поливиниловый спирт; TCM – хлороформ; DCM – дихлорметан; ACTN – ацетон

Figure 1. Optimization of paclitaxel loaded nanoparticles synthesis by direct emulsification and precipitation (n = 3).

Dependences: a – size, nm; b – polydispersity index (PDI); c – drug loading (DL, %); d – zeta potential (z, mV) on the preparation conditions. PVA – polyvinyl alcohol; TCM – chloroform; DCM – dichloromethane; ACTN – acetone

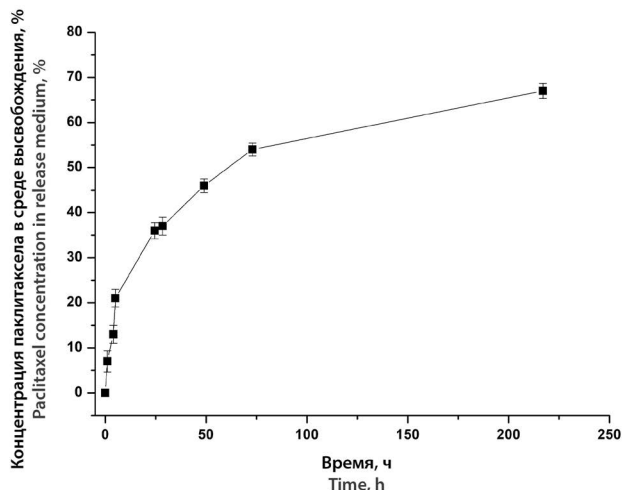


Рисунок 2. Кинетика высвобождения паклитаксела из rAFP3d-NP (среднее \pm SD, n = 3)

Figure 2. Release kinetics of paclitaxel from rAFP3d-NP (mean \pm SD, n = 3)

ных групп 50:50 позволяет получить частицы с наименьшими размерами [15, 19]. Известно, что вязкость полимера также может влиять на размер частиц [20]. Таким образом, для проведения исследований были выбраны сополимеры PLGA-COOH (50:50) с вязкостью 0,2 и 0,4 см³/г (PLGA5002A и PLGA5004A соответственно).

В качестве стабилизатора эмульсии был выбран PVA в концентрациях 0,5, 1 и 2 %, поскольку он широко используется для получения полимерных наночастиц, и его эффективность в сравнении с другими стабилизаторами была доказана ранее [21].

К характеристикам органических растворителей, влияющих на размер частиц, можно отнести поверхностное натяжение и вязкость [22]. Для оценки влияния данных характеристик на параметры наночастиц были выбраны органические растворители: DCM, TCM, TCM/ACTN, в ряду которых значения поверхностного натяжения и вязкости уменьшаются [22]. В случае метода преципитации был использован ацетон, поскольку он является стандартным растворителем для данной методики [23].

Известно, что концентрация PLGA в органической фазе, а также соотношение объема органической фазы к водной (O:W), влияют на размеры и DL за счет изменения вязкости раствора [18]. Ранее нами было показано, что наиболее оптимальные массовые соотношения PLGA:Ptx составляют 5:1 и 10:1 соответственно [16]. Влияние указанных соотношений PLGA:Ptx, а также стандартных соотношений O:W (1:3, 1:5, 1:10 и 1:20) было исследовано в данной работе.

Метод преципитации позволил получить наночастицы с меньшими размерами по сравнению с методом прямого эмульгирования (рисунок 1). Однако при использовании последнего значения DL были

значительно выше, что свидетельствует о более эффективной инкапсуляции Ptx в наночастицы. В связи с чем далее подбор оптимальных параметров проводили по этому методу.

При дальнейшем исследовании были установлены оптимальные параметры получения наночастиц: полимер PLGA5002A, 1 % PVA, DCM в качестве органической фазы, соотношение PLGA:Ptx 10:1, соотношение O:W 1:10. Данные параметры позволили получить наночастицы с наименьшим средним диаметром (263 ± 8 нм) и максимальной эффективностью инкапсуляции (DL 6 масс. %). Полученные частицы обладали дзета-потенциалом $-21,7 \pm 1,4$ мВ, что указывает на их агрегационную устойчивость [24].

Разработка метода получения и обоснование состава rAFP3d-NP

Наиболее распространенным методом конъюгации аминсодержащих молекул с карбоксильными группами является карбодимидный, при использовании которого карбоксильные группы на поверхности частиц (PLGA-COOH) сначала активируются EDC с образованием промежуточного соединения O-ацилизо мочевины. Последующее добавление NHS приводит к образованию более стабильного N-гидроксисуццимидного эфира, который реагирует с первичными аминогруппами белковых молекул [12].

С целью оптимизации процесса получения конъюгата варьировали количество вносимых в реакционную массу EDC, NHS и белковой молекулы (rAFP3d), исходя из концентрации карбоксильных групп 6 мг KOH/г, указанной в спецификации. Мольное соотношение EDC:NHS составило 1:1. Добавление 20-, 10- и 5-кратного мольного избытка EDC и NHS позволило конъюгировать более 89 % внесенного в реакцию белка. Дальнейшее снижение количества EDC и NHS привело к снижению эффективности протекания реакции. Таким образом, использование 5-кратного мольного избытка EDC и NHS являлось оптимальным для данной реакции, поскольку позволяло обеспечивать высокую эффективность конъюгации при минимальных нагрузках.

Пятикратный мольный избыток молекулы rAFP3d использовали для определения максимально возможного связывания белка с карбоксильными группами, присутствующими на поверхности наночастиц. Количество конъюгированного белка определяли колориметрическим методом с бигинхониновой кислотой [25]. Последующее снижение концентрации rAFP3d проводили для уменьшения начальных нагрузок белка с сохранением максимальной эффективности конъюгации. Снижение концентрации белка до соотношения PLGA-COOH:rAFP3d 5:1 не оказывало значительного влияния ($p > 0,05$) на эффективность реакции (таблица 1), при этом концентрация связанного rAFP3d составила 13 масс. %. Эффективность связывания при использовании соотношения PLGA-COOH:rAFP3d 10:1 снизилась до 71 %.

Таблица 1. Оценка эффективности конъюгации векторной молекулы (rAFP3d) с наночастицами [n = 3, среднее ± стандартное отклонение (SD)]

Table 1. Evaluation of the conjugation efficiency [n = 3, mean ± standard deviation (SD)]

Мольные соотношения PLGA:rAFP3d Molar ratios PLGA:rAFP3d	Эффективность конъюгации rAFP3d, % Conjugation efficiency of rAFP3d, %
1:5	89 ± 3
1:1	92 ± 1
2:1	97 ± 2
5:1	95 ± 2
10:1	71 ± 2

Таким образом, было подобрано оптимальное соотношение PLGA-COOH:rAFP3d, равное 5:1, позволяющее при минимальных начальных нагрузках проводить эффективную конъюгацию (95 %) всех доступных на поверхности карбоксильных групп наночастиц с белком.

В качестве криопротекторов исследовали наиболее часто используемые в фармацевтической практике при лиофилизации наночастиц вещества – представители класса «углеводы»: сахароза, глюкоза и D-маннитол («многоатомные спирты»). Выбор криопротектора и его количества проводили, оценивая размер и дзета-потенциал rAFP3d-NP до (контроль) и после лиофилизации (таблица 2).

Таблица 2. Подбор криопротектора для лиофилизации rAFP3d-NP (n = 3, среднее ± SD)

Table 2. Selection of cryoprotectant for lyophilization of rAFP3d-NP (n = 3, mean ± SD)

№	Криопротектор Cryoprotectant	масс. % % w/w	Средний диаметр, нм Size, nm	Дзета-потенциал, мВ Zeta-potential, mV
1	Контроль Control	–	267 ± 8	–24 ± 4
2	Сахароза Sucrose	5	441 ± 4	–7,6 ± 1,6
3		10	302 ± 3	–11,2 ± 1,2
4	Глюкоза Glucose	5	537 ± 4	–9 ± 2
5		10	316 ± 3	–14 ± 5
6	D-маннитол D-mannitol	5	311 ± 9	–21 ± 2
7		10	280 ± 12	–27 ± 5

Использование сахарозы и глюкозы в качестве криопротекторов для получения rAFP3d-NP привело к увеличению среднего диаметра частиц и уменьшению их дзета-потенциала по сравнению с контролем. Частицы с наименьшим средним диаметром и наибольшим значением дзета-потенциала были получены при использовании D-маннитола с концентрацией 10 масс. %.

Исследование кинетики высвобождения паклитаксела из наночастиц

Изучение кинетики высвобождения Ptx из rAFP3d-NP проводили в среде 0,01 М раствора PBS с pH 7,4 при 37 °С. Соотношение массы навески rAFP3d-NP к объему среды рассчитывали, исходя из растворимости паклитаксела в PBS с pH 7,4 (0,3 мкг/мл) [26]. График высвобождения Ptx из rAFP3d-NP представляет собой двухфазный профиль с начальным «скачком» высвобождения паклитаксела (21 % за 5 ч), после чего наблюдается фаза замедленного высвобождения (см. рисунок 2). Вероятно, начальный «скачок» связан с высвобождением Ptx, адсорбированного на поверхности rAFP3d-NP, и с диффузией Ptx, распределенного рядом с поверхностью наночастиц [26]. Последующая фаза медленного высвобождения типична для диффузии вещества из внутренней полости наноразмерной формы и начала гидролитических процессов, приводящих к деградации полимера [26]. Количество Ptx в среде высвобождения за 220 ч составила 65 % от максимального значения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан метод получения наноразмерной формы паклитаксела в составе наночастиц PLGA, конъюгированных с белковой векторной молекулой. Оптимизация параметров получения наночастиц и подбор условий дальнейшей конъюгации позволили получить модифицированные наночастицы со средним диаметром 280 ± 12 нм, эффективность конъюгации составила 95 %. Изучена кинетика высвобождения паклитаксела из rAFP3d-NP *in vitro* и показана возможность пролонгированного высвобождения паклитаксела из полимерной матрицы.

ЛИТЕРАТУРА

- Боят В., Оганесян Е. А., Балабаньян В. Ю., Алятудин Р. Н. Лекарственные формы паклитаксела. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009;8(3):37–44.
- Алятудин Р. Н., Романов Б. К., Лепехин В. К., Бунятян Н. Д., Меркулов В. А., Миронов А. Н. Связанный с альбуминовыми наночастицами паклитаксел – первые шаги нанотехнологий в клиническую практику. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2014;2:10–16.
- Sofias A. M., Dunne M., Storm G., Allen C. The battle of "nano" paclitaxel. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;122:20–30. DOI: 10.1016/j.addr.2017.02.003.
- Dranitsaris G., Yu B., Wang L., Sun W., Zhou Ya., King J., Kaura S., Zhang A., Yuan P. Abraxane® versus Taxol® for patients with advanced breast cancer: A prospective time and motion analysis from a Chinese health care perspective. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2016;22(2):205–211. DOI: 10.1177/1078155214556008.
- Hoogenboezem E. N., Duvall C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;130:73–89. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
- Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*. 2012;161(2):505–522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- Mollaev M., Gorokhovets N., Nikolskaya E., Faustova M., Zabolotsky A., Zhunina O., Sokol M., Zamulaeva I., Severin E., Yabbarov N. Type of pH sensitive linker reveals different time-dependent intracellular localization, *in vitro* and *in vivo* efficiency in alpha-fetoprotein receptor targeted doxorubicin conjugate. *International*

- Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:138–146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.073.
8. Naz Z., Usman S., Saleem K., Ahmed S., Bashir H., Bilal M., Sumrin A. Alpha-fetoprotein: A fabulous biomarker in hepatocellular, gastric and rectal cancer diagnosis. *Biomedical Research*. 2018;29(12):2478–2483. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-17-1550.
 9. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Antitumor activity of targeted nanosome delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, paclitaxel, and a recombinant alpha-fetoprotein fragment. *Nanotechnologies in Russia*. 2012;7(1–2):76–84. DOI: 10.1134/S1995078012010077.
 10. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Dubovik E. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Targeted delivery of paclitaxel-loaded recombinant α -fetoprotein fragment-conjugated nanoparticles to tumor cells. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2011;439(1):158–160. DOI: 10.1134/S160767291104003X.
 11. Albert C., Huang N., Tsapis N., Geiger S., Rosilio V., Mekhloufi G., Chapron D., Robin B., Beladjine M., Nicolas V., Fattal E., Agnely F. Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions. *Langmuir*. 2018;34(46):13935–13945. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02558.
 12. Hermanson G. Bioconjugate techniques. 3rd Edition. Cambridge: Academic press; 2013. 1200 p.
 13. Никольская Е. Д., Яббаров Н. Г., Сокол М. Б., Жунина О. А., Фаустова М. Р., Заболотский А. И., Фомичева М. В., Моллаев М. Д., Помазкова Т. А., Сапелкин М. А. Высокоэффективный способ получения лекарственной формы адресного действия для терапии злокачественных новообразований. Патент РФ на изобретение № RU 2727924 С1. 27.07.2020. Доступно по: <https://istina.msu.ru/patents/379152620/> Ссылка активна на 20.08.2021.
 14. Терещенко О. Г., Никольская Е. Д., Жунина О. А., Заварзина В. В., Яббаров Н. Г., Фомичева М. В., Зубков Е. В., Сокол М. Б., Гукасова Н. В., Северин Е. С. Получение перспективных полимерных форм гепатопротекторов на основе силибина и урсодезокси-хололевой кислоты. *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2018;12:2290–2296.
 15. Sokol M. B., Nikolskaya E. D., Yabbarov N. G., Zenin V. A., Faustova M. R., Belov A. V., Zhunina O. A., Mollaev M. D., Zabolotsky A. I., Tereshchenko O. G., Severin E. S. Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019;107(4):1150–1158. DOI: 10.1002/jbm.b.34208.
 16. Sokol M., Zenin V., Yabbarov N., Mollaev M., Zabolotsky A., Mollaeva M., Fomicheva M., Kuznetsov S., Popenko V., Seregina I., Nikolskaya E. Validated HPLC method for paclitaxel determination in PLGA submicron particles conjugated with α -fetoprotein third domain: Sample preparation case study. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2021;79(5):500–510. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.02.001.
 17. Никольская Е. Д., Яббаров Н. Г., Жунина О. А., Северин Е. С. Конъюгат противоопухолевых препаратов с рекомбинантным альфа-фетопротеином и его функциональными фрагментами и способ их получения. Патент РФ на изобретение № 2630974. 15.09.2017. Доступно по: <https://edrid.ru/rid/218.016.060b.html>. Ссылка активна на 20.08.2021.
 18. Feczko T., Tóth J., Dósa G., Gyenis J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2011;50(8):846–853. DOI: 10.1016/j.cep.2011.05.006.
 19. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., Zhunina O., Mollaev M., Yabbarov N., Tereshchenko O., Popov R., Severin E. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2018;20(1):65–77. DOI: 10.5277/ABB-01028-02.
 20. Haddadi A., Jahan S. T. Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2015;10(1):7371–7384. DOI: 10.2147/IJN.S90866.
 21. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):157–163. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003.
 22. Sahana D. K., Mittal G., Bhardwaj V., Kumar M. N. V. R. PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(4):1530–1542. DOI: 10.1002/jps.21158.
 23. Lebouille J. G. J. L., Stepanyan R., Slot J. J. M., Stuart M. A. C., Tuinier R. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;460: 225–235. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.11.045.
 24. Wan S., Zhang L., Quan Yu., Wei K. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *Royal Society Open Science*. 2018;5(11):181457. DOI: 10.1098/rsos.181457.
 25. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1–4. М.: МЗ РФ; 2018. 7019 с.
 26. Abouelmagd S. A., Sun B., Chang A. C., Ku Y. J., Yeo Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(3):997–1003. DOI: 10.1021/mp500817h.

REFERENCES

1. Bojat V., Oganesyanyan E. A., Balabanyan V. Yu., Alyautdin R. N. Development of therapeutic monoclonal antibodies for oncology: achievements and perspectives. *Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2009;8(3):37–44. (In Russ.)
2. Alyautdin R. N., Romanov B. K., Lepakhin V. K., Bunyatyan N. D., Merkulov V. A., Mironov A. N. Nanoparticle albumin-bound paclitaxel – first step of nanotechnology into clinical practice. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii = Safety and Risk of Pharmacotherapy*. 2014;2:10–16. (In Russ.)
3. Sofias A. M., Dunne M., Storm G., Allen C. The battle of "nano" paclitaxel. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;122:20–30. DOI: 10.1016/j.addr.2017.02.003.
4. Dranitsaris G., Yu B., Wang L., Sun W., Zhou Ya., King J., Kaura S., Zhang A., Yuan P. Abraxane® versus Taxol® for patients with advanced breast cancer: A prospective time and motion analysis from a Chinese health care perspective. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 2016;22(2):205–211. DOI: 10.1177/1078155214556008.
5. Hoogenboezem E. N., Duval C. L. Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018;130:73–89. DOI: 10.1016/j.addr.2018.07.011.
6. Danhier F., Ansorena E., Silva J. M., Coco R., Le Breton A., Pr at V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*. 2012;161(2):505–522. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
7. Mollaev M., Gorokhovets N., Nikolskaya E., Faustova M., Zabolotsky A., Zhunina O., Sokol M., Zamulaeva I., Severin E., Yabbarov N. Type of pH sensitive linker reveals different time-dependent intracellular localization, in vitro and in vivo efficiency in alpha-fetoprotein receptor targeted doxorubicin conjugate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;559:138–146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.073.
8. Naz Z., Usman S., Saleem K., Ahmed S., Bashir H., Bilal M., Sumrin A. Alpha-fetoprotein: A fabulous biomarker in hepatocellular, gastric and rectal cancer diagnosis. *Biomedical Research*. 2018;29(12):2478–2483. DOI: 10.4066/biomedicalresearch.29-17-1550.
9. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Antitumor activity of targeted nanosome delivery systems based on poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, paclitaxel, and a recombinant alpha-fetoprotein fragment. *Nanotechnologies in Russia*. 2012;7(1–2):76–84. DOI: 10.1134/S1995078012010077.
10. Godovannyi A. V., Vorontsov E. A., Gukasova N. V., Pozdnyakova N. V., Vasilenko E. A., Yabbarov N. G., Dubovik E. G., Severin S. E., Severin E. S., Gnuchev N. V. Targeted delivery of paclitaxel-loaded recombinant α -fetoprotein fragment-conjugated nanoparticles to tumor cells. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2011;439(1):158–160. DOI: 10.1134/S160767291104003X.
11. Albert C., Huang N., Tsapis N., Geiger S., Rosilio V., Mekhloufi G., Chapron D., Robin B., Beladjine M., Nicolas V., Fattal E., Agnely F. Bare and Sterically Stabilized PLGA Nanoparticles for the Stabilization of Pickering Emulsions. *Langmuir*. 2018;34(46):13935–13945. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02558.
12. Hermanson G. Bioconjugate techniques. 3rd Edition. Cambridge: Academic press; 2013. 1200 p.

13. Nikol'skaya E. D., Yabbarov N. G., Sokol M. B., Zhunina O. A., Faustova M. R., Zabolotskiy A. I., Fomicheva M. V., Mollaev M. D., Pomazkova T. A., Sapelkin M. A. *Vysokoeffektivnyy sposob polucheniya lekarstvennoy formy adreznogo deystviya dlya terapii zlokachestvennykh novoobrazovaniy* [Highly effective method for preparing dosage form of targeted action for therapy of malignant growth]. Patent RUS № 2727924 C1. 27.07.2020. Available at: <https://istina.msu.ru/patents/379152620/>. Accessed: 20.08.2021. (In Russ.)
14. Tereshchenko O. G., Nikolskaya E. D., Zhunina O. A., Zavarzina V. V., Yabbarov N. G., Fomicheva M. V., Zubkov E. V., Sokol M. B., Gukasova N. V., Severin E. S. Formulation of perspective hepatoprotector polymeric forms based on silybin and ursodeoxycholic acid. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya = Russian Chemical Bulletin*. 2018;12:2290–2296. (In Russ.)
15. Sokol M. B., Nikolskaya E. D., Yabbarov N. G., Zenin V. A., Faustova M. R., Belov A. V., Zhunina O. A., Mollaev M. D., Zabolotskiy A. I., Tereshchenko O. G., Severin E. S. Development of novel PLGA nanoparticles with co-encapsulation of docetaxel and abiraterone acetate for a highly efficient delivery into tumor cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2019;107(4):1150–1158. DOI: 10.1002/jbm.b.34208.
16. Sokol M., Zenin V., Yabbarov N., Mollaev M., Zabolotskiy A., Mollaeva M., Fomicheva M., Kuznetsov S., Popenko V., Seregina I., Nikolskaya E. Validated HPLC method for paclitaxel determination in PLGA submicron particles conjugated with α -fetoprotein third domain: Sample preparation case study. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 2021;79(5):500–510. DOI: 10.1016/j.pharma.2021.02.001.
17. Nikol'skaya E. D., Yabbarov N. G., Zhunina O. A., Severin E. S. *Kon'yugat protivopukhoglevykh preparatov s rekombinantnym al'fa-fetoproteinom i ego funktsional'nymi fragmentami i sposob ikh polucheniya* [Conjugate of anticancer drugs with recombinant alpha-fetoprotein and its functional fragments and method for their preparation]. Patent RUS № 2630974. 15.09.2017. Available at: <https://edrid.ru/rid/218.016.060b.html>. Accessed: 20.08.2021. (In Russ.)
18. Feczko T., Tóth J., Dósa G., Gyenis J. Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2011;50(8):846–853. DOI: 10.1016/j.cep.2011.05.006.
19. Nikolskaya E., Sokol M., Faustova M., Zhunina O., Mollaev M., Yabbarov N., Tereshchenko O., Popov R., Severin E. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*. 2018;20(1):65–77. DOI: 10.5277/ABB-01028-02.
20. Haddadi A., Jahan S. T. Investigation and optimization of formulation parameters on preparation of targeted anti-CD205 tailored PLGA nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2015;10(1):7371–7384. DOI: 10.2147/IJN.S90866.
21. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A., Vanchugova L., Shipulo E., Abbasova K., Berdiev R., Wohlfart S., Chepurnova N., Kreuter J. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2010;74(2):157–163. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003.
22. Sahana D. K., Mittal G., Bhardwaj V., Kumar M. N. V. R. PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;97(4):1530–1542. DOI: 10.1002/jps.21158.
23. Lebouille J. G. J. L., Stepanyan R., Slot J. J. M., Stuart M. A. C., Tuinier R. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2014;460:225–235. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.11.045.
24. Wan S., Zhang L., Quan Yu., Wei K. Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *Royal Society Open Science*. 2018;5(11):181457. DOI: 10.1098/rsos.181457.
25. *Gosudarstvennaya Farmakopeya Rossiyskoy Federatsii. XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. V. 1–4. Moscow: Ministerstvo zdravookhraneniya Rossiyskoy Federatsii; 2018. 7019 p. (In Russ.)
26. Abouelmagd S. A., Sun B., Chang A. C., Ku Y. J., Yeo Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right? *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(3):997–1003. DOI: 10.1021/mp500817h.