

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ ХИМИКО-  
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Д.И. МЕНДЕЛЕЕВА»

*На правах рукописи*

Ковшова Татьяна Сергеевна

**Биофармацевтический анализ наносомальной формы доксорубина на  
основе сополимера молочной и гликолевой кислот**

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, доцент

Балабаньян Вадим Юрьевич

**Научный консультант:**

доктор химических наук

Гельперина Светлана Эммануиловна

Москва – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Доксорубицин в качестве противоопухолевого агента .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Наноразмерные носители для доставки лекарств.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3. Наноразмерные системы доставки лекарственных веществ для противоопухолевой терапии.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Системы доставки доксорубицина на основе наночастиц: фармакокинетика, эффективность и безопасность.....</b>	<b>25</b>
<b>1.5. Подходы к доставке лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц: роль модификации поверхности НЧ при помощи ПАВ.....</b>	<b>32</b>
<b>1.6. Системы доставки доксорубицина для терапии глиобластомы на основе полимерных наночастиц.....</b>	<b>36</b>
<b>1.7. Роль оценки корреляции свойств наночастиц <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> в фармацевтической разработке нано-препаратов на их основе.....</b>	<b>37</b>
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Реактивы и расходные материалы.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2. Оборудование.....</b>	<b>41</b>
<b>2.3. Получение наносомальной формы доксорубицина (PLGA-Dox).....</b>	<b>43</b>
2.3.1. Получение наночастиц PLGA-Dox.....	43
2.3.2. Получение наночастиц плацебо-PLGA.....	45
<b>2.4. Оптимизация методов оценки и стандартизации физико-химических параметров наночастиц PLGA, нагруженных доксорубицином.....</b>	<b>45</b>
2.4.1. Определение размеров PLGA наночастиц и распределения по размерам.....	45
2.4.2. Определение заряда поверхности PLGA наночастиц.....	47
2.4.3. Определение размера и морфологии поверхности PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, с помощью просвечивающей электронной микроскопии.....	48
2.4.4. Определение содержания полимера в PLGA наночастицах.....	48
2.4.5. Определение числа карбоксильных групп на поверхности PLGA наночастиц.....	49
2.4.6. Определение общего содержания доксорубицина в PLGA наночастицах и степени включения методом спектрофотометрии.....	49
2.4.6.1. Метод центрифугирования.....	49
2.4.6.2. Метод ультрафильтрации.....	50
2.4.6.3. Метод гель-фильтрации.....	51
2.4.7. Определение общего содержания доксорубицина в PLGA наночастицах и степени включения методом ВЭЖХ.....	51
2.4.8. Определение примесей доксорубицина в образцах PLGA-Dox НЧ методом ВЭЖХ.....	53
2.4.9. Определение содержания остаточного ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ.....	55

2.4.10. Определение содержания воды в образцах PLGA-Dox.....	55
2.4.11. Изучение стабильности PLGA-Dox и плацебо-PLGA НЧ при хранении.....	56
<b>2.5. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ <i>in vitro</i>.....</b>	<b>56</b>
2.5.1. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц в простые модельные среды <i>in vitro</i> .....	57
2.5.1.1.Метод центрифугирования.....	57
2.5.1.2.Метод диализа.....	58
2.5.2. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц в плазме крови человека <i>in vitro</i> .....	59
2.5.2.1.Приготовление калибровочных стандартов и образцов PLGA-Dox НЧ.....	59
2.5.2.2. Методика подготовки образцов, используемая для определения общей концентрации доксорубина в плазме человека для калибровки и образцов наночастиц PLGA.....	61
2.5.2.3.Методика подготовки образцов, используемая для определения концентрации свободного доксорубина в плазме человека.....	62
2.5.2.4.Параметры ВЭЖХ анализа.....	62
2.5.2.5. Методика изучения профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц в плазме крови <i>in vitro</i> .....	63
2.5.3. Математическое описание кинетики высвобождения доксорубина из наночастиц <i>in vitro</i> .....	64
<b>2.6. Изучение гидролитической деградации PLGA-Dox и плацебо-PLGA НЧ и параметров, влияющих на скорость деградации.....</b>	<b>66</b>
2.6.1. Изучение параметров полимеров, используемых для получения наночастиц.....	66
<b>2.7. Изучение сорбции полксамера 188 на поверхности PLGA-Dox наночастиц.....</b>	<b>69</b>
<b>2.8.Оценка гемолитической активности PLGA-Dox наночастиц.....</b>	<b>70</b>
<b>2.9.Изучение связывания PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови человека.....</b>	<b>71</b>
<b>2.10.Фармакокинетика наносомальных форм доксорубина на основе PLGA с различным профилем высвобождения доксорубина в плазме крови крыс.....</b>	<b>72</b>
2.10.1. Приготовление калибровочных стандартов.....	74
2.10.2. Методика подготовки образцов, используемая для определения концентрации доксорубина в плазме крыс для калибровки.....	75
2.10.3. Методика подготовки образцов, используемая для определения свободного и общего доксорубина в плазме крыс.....	75
2.10.4. Параметры ВЭЖХ анализа.....	75
2.10.5. Анализ фармакокинетических данных.....	76
<b>2.11. Статистический анализ данных.....</b>	<b>79</b>
<b>Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>80</b>
<b>3.1. Получение наночастиц PLGA, нагруженных доксорубином, и оптимизация методов оценки их физико-химических параметров.....</b>	<b>81</b>
3.1.1. Оптимизация методов оценки размера, распределения по размерам и $\zeta$ -потенциала поверхности PLGA-Dox наночастиц.....	82
3.1.2. Оптимизация методов оценки общего содержания доксорубина и его примесей.....	89

3.1.3. Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ.....	93
3.1.4. Количественная оценка содержания ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ.....	99
<b>3.2. Оптимизация методов изучения и подходов к математическому описанию кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ <i>in vitro</i> в модельные среды и плазму.</b>	<b>102</b>
3.2.1. Выбор метода исследования кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц.....	103
3.2.1.1. Метод центрифугирования для изучения профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ.....	106
3.2.1.2. Метод диализа для изучения профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ.....	111
3.2.2. Изучение влияния pH среды на профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ.....	114
3.2.3. Изучение подходов к математическому описанию кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ.....	116
<b>3.3. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ в плазме человека.....</b>	<b>119</b>
<b>3.4. Изучение факторов, влияющих на профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ.....</b>	<b>125</b>
3.4.1. Влияние pH внешней водной фазы при получении PLGA-Dox НЧ методом двойных эмульсий.....	128
3.4.2. Влияние свойств полимера (молекулярный вес, вязкость, кислотное число, остаточное содержание мономера.....	129
3.4.3. Влияние изменения состава полилактидной матрицы наночастиц.....	133
3.4.4. PLGA-Dox НЧ с медленным высвобождением доксорубина.....	136
<b>3.5. Изучение сорбции полксамера 188 на поверхности PLGA-Dox НЧ.....</b>	<b>139</b>
<b>3.6. Изучение влияния параметров наносомальной формы доксорубина на основе PLGA на распределение между плазмой и эритроцитами крови.....</b>	<b>141</b>
<b>3.7. Исследование фармакокинетики наносомальных форм доксорубина с различным профилем высвобождения в плазме крови крыс.....</b>	<b>147</b>
3.7.1. Анализ фармакокинетических данных внемодельным методом.....	152
3.7.2. Анализ фармакокинетических данных с помощью PBVB модели.....	156
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>162</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>163</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>	<b>165</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>166</b>
<b>СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (ТАБЛИЦЫ).....</b>	<b>197</b>
<b>СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (РИСУНКИ).....</b>	<b>200</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования.**

В настоящее время общая смертность от злокачественных новообразований во всем мире продолжает расти и по данным ВОЗ составит 13,1 млн в 2030 году. Антрациклиновый антибиотик доксорубин (Dox) представляет собой один из наиболее изученных и эффективных химиотерапевтических препаратов и применяется для лечения широкого спектра солидных злокачественных новообразований и гемобластозов. Вместе с тем, для лечения злокачественных новообразований мозга – глиобластом Dox не применяется, поскольку является субстратом Р-гликопротеина, ввиду чего не проникает через гематоэнцефалический барьер в терапевтически значимых концентрациях. В качестве направления модификации лекарственной формы может выступать создание наноразмерных систем доставки Dox, которые могли бы преодолевать ГЭБ и эффективно доставлять Dox в мозг. Создание лекарственных форм (ЛФ) на основе коллоидных носителей, в том числе наночастиц (НЧ) на основе биodeградируемых полимеров, таких как сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) является одним из наиболее перспективных направлений современной фармацевтической технологии [1].

Наносомальная форма Dox на основе PLGA НЧ (PLGA-Dox), модифицированных полуксамером 188 (P188), проявила высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс [2; 3]. В то же время влияние физико-химических параметров наносомальной формы на профиль высвобождения Dox *in vitro* и фармакокинетику *in vivo* остается недостаточно изученным. Высокая противоопухолевая активность и безопасность данной формы [4; 5], свидетельствующие о ее перспективности для клинического применения, послужили обоснованием необходимости углубленного исследования факторов, влияющих на высвобождение Dox из PLGA-Dox НЧ *in vitro* и *in vivo*, что, в свою очередь, потребовало проведения биофармацевтического анализа наносомальной формы с учетом особенностей ЛФ на основе коллоидных носителей.

### **Степень разработанности научной проблемы.**

Нагруженные Dox НЧ, модифицированные P188, ранее продемонстрировали высокий противоопухолевый эффект в отношении интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс при внутривенном введении, который проявлялся в виде значительного увеличения продолжительности жизни животных и гистологически подтвержденного ингибирования роста опухоли, что свидетельствовало об эффективной доставке Dox через ГЭБ в опухоль [2; 3]. Ранее было показано, что основным механизмом интернализации НЧ в клетки глиобластомы человека U87MG является клатрин-зависимый эндоцитоз [6]. Данная форма не оказывала влияния на

свертывающую систему крови и не вызывала гемолиз эритроцитов, что подтверждает ее хорошую гемосовместимость [7]. Результаты доклинического токсикологического исследования данной формы показали, что включение доксорубина в состав PLGA НЧ, покрытых полоксамером 188, позволило снизить его кардио- и тестикулярную токсичность, а также гематотоксичность [5]. Клиническое исследование I фазы у пациентов с рецидивирующими солидными опухолями, включая мультиформную глиобластому, выявило удовлетворительную безопасность и переносимость наносомальной формы доксорубина в дозах до 90 мг/м<sup>2</sup> [4]. Разработка лекарственных форм на основе коллоидных носителей, в том числе, полимерных НЧ, требует комплексного анализа физико-химических параметров НЧ, которые могут оказывать влияние на профиль высвобождения *in vivo*, связывание компонентами крови (белки, форменные элементы), фармакокинетику и биораспределение, эффективность и профиль токсичности НЧ. Вместе с тем, остаются до конца не решенными аспекты фармацевтической разработки, связанные с оценкой степени включения и профиля высвобождения Dox из полимерной матрицы и установлением взаимосвязи этих параметров с фармакокинетическими параметрами наносомальной формы на основе PLGA. В связи с этим необходимо было разработать подходы для получения PLGA-Dox НЧ с разным профилем высвобождения доксорубина и исследовать фармакокинетику этих форм. Для установления влияния параметров наносомальной формы на ее свойства *in vitro* / *in vivo* необходимо было разработать и оптимизировать методы оценки параметров с учетом особых свойств, присущих коллоидным системам доставки, в том числе методов определения размера и распределения НЧ по размерам, ζ-потенциала поверхности НЧ, степени включения и нагрузки ЛВ в НЧ, профиля высвобождения *in vitro* в модельные среды и плазму.

**Целью** настоящего исследования явилось получение, биофармацевтический анализ и изучение фармакокинетики наносомальных форм доксорубина на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) с различным профилем высвобождения доксорубина.

**Задачи исследования:**

- Разработать методы получения наносомальных форм доксорубина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) с различным профилем высвобождения доксорубина.
- Исследовать физико-химические параметры наносомальных форм и профиль высвобождения доксорубина из полимерной матрицы *in vitro*.
- Изучить распределение полученных наносомальных форм доксорубина между плазмой и эритроцитами крови и их гемосовместимость.
- Разработать и валидировать биоаналитические методики количественного определения свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) доксорубина в плазме крови для

исследований *in vitro* и *in vivo*.

- Исследовать фармакокинетику наносомальных форм с различным профилем высвобождения доксорубина в плазме крови крыс при однократном внутривенном введении;
- Оценить возможность прогнозирования профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vivo* на основании анализа фармакокинетических данных зависимости «концентрация в плазме – время» с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели.

#### **Научная новизна.**

- Выявлены факторы, обеспечивающие возможность получения наночастиц на основе PLGA с заданными физико-химическими параметрами и профилем высвобождения доксорубина: pH внешней водной фазы эмульсии, молекулярный вес PLGA, наличие и количество концевых карбоксильных групп PLGA, введение противоиона для получения гидрофобного комплекса с доксорубином.
- Изучено влияние параметров наносомальной формы доксорубина на распределение между плазмой и эритроцитами крови человека. Установлено, что включенный в наночастицы доксорубин в эксперименте *in vitro* связывается с эритроцитами крови человека в меньшей степени, чем свободный доксорубин.
- Изучена фармакокинетика наносомальных форм с различным профилем высвобождения доксорубина. По сравнению с субстанцией наносомальные формы доксорубина отличались более высокими значениями AUC и, особенно,  $AUC_{0-1h}$ , низким значением клиренса и низким объемом распределения, что свидетельствует о влиянии лекарственной формы на биораспределение доксорубина.
- Исследована возможность прогнозирования профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vivo* на основании экспериментально полученных фармакокинетических данных зависимости «концентрация в плазме – время» с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели. Более высокая степень включения и, соответственно, низкая скорость высвобождения доксорубина в модельных средах и плазме *in vitro*, коррелировала с более высокой спрогнозированной скоростью высвобождения доксорубина *in vivo* и более высокой нацеливающей способностью наносомальной формы.

#### **Теоретическая и практическая значимость.**

Выявлены параметры, определяющие качество наносомальной формы Dox на основе PLGA. Оптимизированы методики стандартизации наносомальной формы Dox, в том числе методы анализа физико-химических параметров наночастиц (размер и распределение по размерам,  $\zeta$ -потенциал поверхности, количественное содержание Dox и PLGA, примесей и вспомогательных веществ, степень включения и нагрузка Dox в НЧ, остаточное содержание

воды), профиля гидролитической деградаци НЧ, а также профиля высвобождения Dox из НЧ *in vitro* в модельные среды и плазму. Разработанные в данном исследовании подходы к получению и анализу наноразмерных форм на основе PLGA с заданным профилем высвобождения Dox в дальнейшем могут быть использованы для прогнозирования фармакокинетики и противоопухолевой активности наносомальной формы Dox *in vivo* путем установления *in vitro* / *in vivo* корреляций (IVIVC). Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности включения показателя «профиль высвобождения доксорубицина» в нормативную документацию на готовое лекарственное средство. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, внедрены в деятельность лаборатории готовых лекарственных средств Санкт-Петербургского Института Фармации, а также в учебный процесс кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «МГУ имени М. В. Ломоносова».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Методы получения наносомальных форм доксорубицина на основе PLGA с различной степенью включения и профилем высвобождения доксорубицина.
- Физико-химические параметры наносомальных форм и профиль высвобождения доксорубицина из полимерной матрицы *in vitro* и методы их изучения.
- Различия в распределении свободного и включенного в PLGA-Dox НЧ между плазмой и эритроцитами крови.
- Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубицина с различным профилем высвобождения доксорубицина, рассчитанные внемодельным методом и с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Диссертационная работа соответствует формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 2, 3 и 4 паспорта специальности:

- 2 - Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.
- 3 - Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.
- 4 - Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

### **Личный вклад автора.**

Автор принимал непосредственное участие в получении наносомальных форм доксорубицина с различным профилем высвобождения; оптимизации методов и проведении их физико-химического анализа; проведении исследований кинетики высвобождения Dox из НЧ *in vitro* в модельных средах и плазме крови, профиля гидролитической деградации НЧ; проведении фармакокинетического исследования (разработка дизайна исследования, отбор проб, оптимизация методики пробоподготовки, количественный анализ Dox в плазме крови крыс); проведении исследования по оценке взаимодействия PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови и оценке гемолитической активности НЧ; а также анализе и оформлении полученных результатов и подготовке публикаций.

### **Степень достоверности и апробация результатов.**

Достоверность научных положений и выводов базируется на достаточных по своему объему данных и количеству материала, современных методах исследования и статистической обработке данных.

Результаты диссертации были доложены на конференциях: II Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, Россия, ноябрь 2019); CRS 2020 Virtual Annual Meeting (США, июль 2020); Юбилейная V Междисциплинарная конференция «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019) (Судак, Россия, сентябрь 2019); Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020» (Москва, Россия, сентябрь 2020); XI Международная конференция (онлайн-конгресс) «BIONANOTOX – 2020» (Греция, сентябрь 2020), VI Междисциплинарная конференция "Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии" МОБИ-ХИМФАРМА 2020 (Нижний Новгород, Россия, сентябрь 2020), III Международная научно-практическая конференция «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, Россия, ноябрь 2020).

Основные материалы исследования отражены в 7 публикациях, среди которых 4 статьи в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus и Web of Science), 3 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, а также 9 тезисов докладов, представленных на международных конференциях.

Апробация диссертации была проведена на заседании кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 1 от 10.02.2021) и на расширенном заседании кафедры Химии и технологии биомедицинских препаратов с участием сотрудников Инжинирингового центра «Продукты и технологии органического синтеза» РХТУ им. Д. И. Менделеева (протокол № 5 от 10.02.2021 г.)

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 20-015-00276 «Поиск *in vitro* / *in vivo* корреляций для прогнозирования фармакокинетики и противоопухолевой активности наносомальной формы доксорубина» и №19-015-00155 «Изучение зависимости релиза активного компонента из полилактидных нано- и микроразмерных лекарственных форм от профиля их гидролитической деградации».

**Объем и структура диссертации** Диссертация работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 205 страницах, содержит 44 таблицы и 45 рисунков. Список литературы включает 318 ссылок.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В данном обзоре рассмотрены системы доставки лекарственных веществ на основе наноразмерных носителей для лечения онкологических заболеваний, в частности, опухолей мозга. Освещены подходы к доставке лекарственных веществ в ткани мозга с помощью полимерных наночастиц посредством преодоления гематоэнцефалического барьера. Особое внимание уделено результатам исследований фармакокинетики, эффективности и безопасности наносомальных форм доксорубицина. Рассмотрены перспективы использования наноразмерных форм доксорубицина для терапии мультиформной глиобластомы. Освещена также роль оценки корреляции свойств наночастиц *in vitro* / *in vivo* в фармацевтической разработке нано-препаратов на их основе.

### 1.1. Доксорубицин в качестве противоопухолевого агента

Доксорубицин, также известный как адриамицин, был впервые выделен из культуры актиномицетов *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* в ходе исследований компании Farmitalia Research Laboratories (Милан, Италия) в начале 1960-х годов и принадлежит к классу антрациклиновых антибиотиков [8]. В настоящее время доксорубицин является одним из наиболее часто назначаемых и эффективных противоопухолевых ЛВ, когда-либо разработанных для лечения различных онкологических заболеваний у взрослых и детей [9]. В 1974 г доксорубицин был зарегистрирован для клинического применения в США. Доксорубицин в качестве монотерапии или в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами и сегодня является терапией первой линии различных видов солидных опухолей: рака молочной железы, в том числе метастатического, рака предстательной железы, рака яичников, мочевого пузыря и легких, саркомы Капоши (саркома мягких тканей) и др. Кроме того, доксорубицин широко используется для лечения опухолей у детей (например, нефробластома), лейкозов, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы и других видов злокачественных новообразований [10].

По химической структуре доксорубицин является антрациклиновым антибиотиком, в молекуле которого плоский антрахинон ядра связан через гликозидную связь (C7) с аминоксахаром, даунозамином (Рисунок 1). Для увеличения растворимости в воде аминоксигруппу гликозидной части молекулы протонируют путем образования доксорубицина гидрохлорида. Молекула доксорубицина является амфифильной (ядро антрахинона – липофильная часть; даунозамин – гидрофильная часть) и амфотерной (кислотные фенольные группы и основные группы даунозамина), что обеспечивает связывание с клеточными мембранами и белками. В

основе антимитотической и цитотоксической активности доксорубицина лежит несколько механизмов. В частности, доксорубицин образует комплексы с ДНК путем интеркаляции между двумя парами оснований ДНК [11], что нарушает экспрессию генов; ингибирует активность топоизомеразы II (ДНК-гираза II, вносит двуцепочечный разрыв в ДНК), которая играет важную роль в синтезе и репликации ДНК, стабилизируя при этом комплекс ДНК-топоизомераза II; ингибирует активность ДНК- и РНК-полимераз. Наконец, метаболизм доксорубицина вызывает выработку активных форм кислорода, оказывающих повреждающее действие на ДНК и нарушающих ее синтез [12].

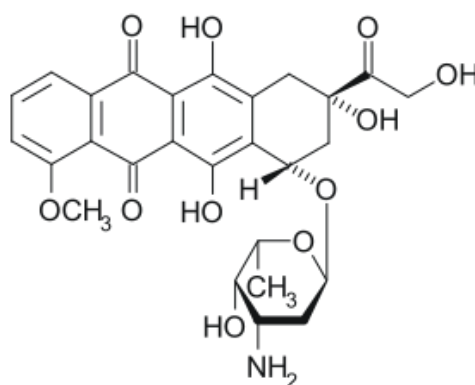


Рисунок 1 – Химическая структура доксорубицина

К сожалению, мощный противоопухолевый эффект доксорубицина сопряжен с выраженными побочными эффектами. Наряду с общими токсическими эффектами (подавление кроветворения, тошнота, рвота и алопеция), развитием резистентности, в том числе адаптивной множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), выраженной кардиотоксичностью, которая имеет кумулятивный характер и вызывает застойную кардиомиопатию [9; 13]. Несмотря на почти 60-летние исследования, механизмы кардиотоксичности доксорубицина до конца не изучены. По всей видимости, данный процесс является многоступенчатым [14]; при этом в качестве возможных механизмов, приводящих к гибели кардиомиоцитов, рассматривают оксидативный и нитрозативный стресс, дисрегуляцию уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, индукцию апоптоза (p53), нарушение регуляции гомеостаза, изменение структуры саркомера, ингибирование экспрессии кардиомиоцит-специфических генов и др. [15-17]. При этом было показано, что кардиотоксичность возрастает с увеличением пикового уровня концентраций доксорубицина в плазме [18].

Попытки снизить кардиотоксичность доксорубицина привели к синтезу более 2000 его аналогов, однако лишь немногие из них, в том числе, идарубицин, эпирубицин и негликозидный аналог митоксантрон нашли применение в практике [17]. При этом профиль

токсичности аналогов не существенно отличался от токсичности доксорубицина; он и в настоящее время применяется в качестве химиотерапии первой линии целого ряда онкологических заболеваний. Альтернативной стратегией, направленной на снижение побочных эффектов противоопухолевых агентов, в том числе, доксорубицина, является их включение в состав коллоидных, наноразмерных, систем доставки. Использование таких систем позволяет в ряде случаев исправить такие существенные недостатки ЛВ, как низкая стабильность / быстрый метаболизм, ограниченное проникновение ЛВ в клетки и низкие внутриклеточные концентрации (низкая доступность внутриклеточных мишеней), отсутствие клеточной / тканевой специфичности (ограниченная активность + токсичность) и т.д.

## 1.2. Наноразмерные носители для доставки лекарств

Концепция адресной доставки лекарств, которые поражают бы болезнь, как «волшебная пуля», не нанося вреда здоровым органам, была впервые предложена великим немецким бактериологом Паулем Эрлихом в конце XIX века. Действительно, недостаточная селективность действия лекарств часто снижает результативность лечения, а попытка компенсировать этот недостаток путем повышения дозы обычно приводит к усилению нежелательных побочных эффектов. Важным шагом в этом направлении стала концепция контролируемого (замедленного) высвобождения ЛВ, возникшая в 1950-1960 годы благодаря развитию фармакокинетики, которая привела к созданию разнообразных лекарственных форм, обеспечивающих пролонгированное терапевтическое действие. Альтернативной стратегией, также направленной на изменение фармакокинетики и биораспределения ЛВ, стала разработка коллоидных систем доставки. Первым успешным представителем таких носителей стали липосомы – капсулы из замкнутого липидного слоя (или слоев), который состоит из синтетических или природных фосфолипидов. В экспериментальных исследованиях (*in vitro* / *in vivo*) была показана возможность создания липосомальных лекарственных форм для местного (на кожу или слизистую), ингаляционного, энтерального (перорального, сублингвального) и парентерального введения и, в ряде случаев, их большая эффективность и преимущества по сравнению со стандартными формами активных молекул [19]. Успехи, достигнутые в этой области, а также развитие химии полимеров привели к созданию новых носителей – полимерных наночастиц. Пионерами в этой области стали профессор Питер Пауль Шпайзер и его ученики Герд Бирренбах, Патрик Куврё, Йорг Кройтер (Швейцарский федеральный технологический институт, Цюрих), которые впервые получили и описали биodeградируемые НЧ из полиметилметакрилата и полиалкилцианоакрилатов в качестве

адьювантов для вакцин и носителей ЛВ [20]. Концепция «волшебной пули» актуальна по сей день, одним из наиболее перспективных подходов к повышению селективности является применение коллоидных систем доставки, позволяющих повысить концентрацию лекарства в мишени – органе или клетке.

Согласно определению, приведенному в Энциклопедии фармацевтической технологии, наночастицы – это твёрдые коллоидные частицы размером от 10 до 1000 нм. Активный ингредиент может быть инкапсулирован внутри ядра частицы, адсорбирован на её поверхности или присоединён к ней ковалентной связью [21]. В литературе описаны различные наноразмерные носители ЛВ для фармацевтического применения в фармацевтике и биомедицинских исследованиях (таблица 1). При этом наиболее целесообразно применение частиц размером от 100 до 500 нм. Такие частицы достаточно малы, чтобы не создавать опасности тромбоэмболии, и потому пригодны для внутрисосудистого введения; вместе с тем они обладают оптимальной для удерживания ЛВ удельной поверхностью, тогда как при уменьшении размеров удельная поверхность НЧ значительно возрастает, что приводит к слишком быстрому выделению адсорбированных и инкапсулированных веществ и снижению агрегационной устойчивости наносuspензий [22].

Несмотря на многообразие носителей с уникальными свойствами, лишь немногие из них могут применяться в медицине. Основными критериями, определяющими возможность применения наночастиц для создания лекарственных препаратов, являются биосовместимость (отсутствие негативных реакций и иммунного ответа при контакте с клетками и тканями живого организма) и способность к деградации в организме (т.е. к биodeградации) [23]. По способности к ферментативной или гидролитической деградации можно выделить биodeградируемые носители, такие как нанокапсулы и наносферы из биodeградируемых полимеров, агрегаты амфифильных полимеров, полиплексы, липидные носители (липосомы, наночастицы из твёрдых липидов, липоплексы), и носители, не способные к деградации: дендримеры, углеродные носители (нанотрубки, фуллерены), металлические НЧ и другие. Ввиду меньшей потенциальной токсичности, именно наночастицы из биodeградируемых материалов, в том числе, липосомы, полимерные наносферы и нанокапсулы, агрегаты амфифильных полимеров представляют интерес в качестве систем доставки лекарств [24].

Таблица 1 – Типы коллоидных систем, используемых для доставки ЛВ [25; 26]

Тип	Типичные размеры	Характеристика
<i>На основе липидов</i>		
Липосомы	100—200	Капсулы, внешняя мембрана которых состоит из природных фосфолипидов; активный ингредиент растворен во внутренней водной фазе или в липидной мембране
Наночастицы из твердых липидов	100—500	Частицы из твердых липидов; активный ингредиент распределен (растворен) в твердой фазе и адсорбирован на поверхности
<i>На основе полимеров</i>		
Полимерные наночастицы	100—500	Твердые частицы из полимеров (природных или синтетических); активный ингредиент распределен (растворен) в твердой фазе и/или адсорбирован на поверхности
Полимерные нанокапсулы	100—300	Капсулы с внутренней масляной фазой, внешняя оболочка состоит из биodeградируемых полимеров; активный ингредиент растворен во внутренней фазе
Наногели	50—250	Частицы из гидрофильного геля, состоящего из поперечно-сшитых полимеров (например, ПЭГ-полиэтиленимин или полисахариды)
<i>Самоорганизующиеся</i>		
Полимерные мицеллы	20—150	Самоорганизующиеся мицеллы из блок-сополимеров типа А-В или А-В-А; активный ингредиент солюбилизирован или ковалентно связан с полимером
Полиплексы/ липоплексы	50—150	Комплексы ДНК с поликатионами или положительно заряженными липидами
Самоорганизующиеся наноагрегаты амфифильных молекул	10—100	Наноразмерные агрегаты, образованные в водных системах низкомолекулярными полимерами, содержащими гидрофильные и гидрофобные фрагменты, например, поли-N-винилпирролидона
<i>Супрамолекулярные</i>		
Дендримеры	5—10	Сверхразветвленные полимеры, макромолекулы которых имеют сферическую форму; активный ингредиент иммобилизован во внутренних полостях макромолекул
<i>Неорганические</i>		
Суперпара-магнитные наночастицы	50-300	Наночастицы, в основном на основе оксидов железа ( $Fe_3O_4$ и $\gamma-Fe_2O_3$ ), имеющие постоянный или наведённый магнитный момент
Квантовые точки	2-10	Нанокристаллы на основе полупроводниковых материалов, в которых движение электронов ограничено в трех пространственных направлениях, выращенные в растворе и покрытые монослоем молекул органического стабилизатора и обладающие зависящим от размера энергетическим спектром

Липосомы составляют подавляющее большинство (>50%) среди одобренных для медицинского применения наноразмерных лекарственных форм. Биосовместимость и низкая токсичность обусловлены тем, что по своему составу липосомы состоят из природных или синтетических фосфолипидов, структурных компонентов клеточных мембран [27]. Отправной точкой в использовании нано-препаратов на основе липосом в клинике стало выведение препарата Doxil®/Caelyx® (липосомальный доксорубин) на рынок США в 1995 году для лечения пациентов с раком яичников и саркомой Капоши, связанной со СПИДом, после предшествующей неудачной системной химиотерапии или при непереносимости такой терапии. Это был первый наноразмерный липосомальный препарат, который получил разрешение регуляторного органа. Позже, компания NeXstar Pharmaceuticals (США) также разработала липосомальный даунорубин (DaunoXome®), который был одобрен FDA США в 1996 году для лечения прогрессирующей саркомы Капоши, связанной с ВИЧ. Впоследствии, для терапии злокачественных новообразований стали доступны еще несколько нанопрепаратов, такие как Depocyt® (SkyPharma Inc.), Myocet® (Elan Pharmaceuticals), Mepact® (Takeda Pharmaceutical) и Marqibo® (Talon Therapeutics), Onivyde™ (Merrimack Pharmaceuticals, Inc.) и другие. Для лечения грибковых инфекций в США были одобрены нано-препараты амфотерицина В – Amphotec® (1996) и Ambisome® (1997). Кроме того, липосомы стали важными носителями в разработке вакцин и интерес к таким вакцинам заметно возрос после выведения на рынок нано-вакцин Epxal® и Inflexal® V (Crucell, Berna Biotech) для вакцинации против гепатита и гриппа, соответственно [28; 29].

Носители на основе полимерных НЧ отличаются большей стабильностью, чем липосомы. Они могут быть получены из полимеров как природного (альбумин, хитозан, альгинат, желатин), так и синтетического (полилактиды, сополимеры молочной и гликолевой кислот, различные полиакрилаты и др.) происхождения. Различные типы полимеров, используемые для получения наносфер и микрокапсул, представлены на рисунке 2. Полимерные НЧ в основном используют для доставки ЛВ, ограниченно растворимых в воде, поскольку ядро НЧ обычно обладает гидрофобными свойствами [30; 31]. Основные требования к полимерам, используемым для получения наноносителей – это биосовместимость и способность к биодegradации. Эти требования ограничивают выбор полимеров, которые могут быть использованы для доставки лекарств. Полилактиды – гомополимеры молочной кислоты (PLA, *англ.* PolyLactic Acid) и ее сополимеры с гликолевой кислотой (PLGA, *англ.* Poly(Lactide-co-Glycolide) Acid), а также полиалкилцианоакрилаты (PACA, *англ.* poly(alkylcyanoacrylates)) являются примерами относительно безопасных (малотоксичных) синтетических полимеров, подходящих для создания наносомальных лекарственных форм вследствие их биосовместимости и способности к деградации в организме.

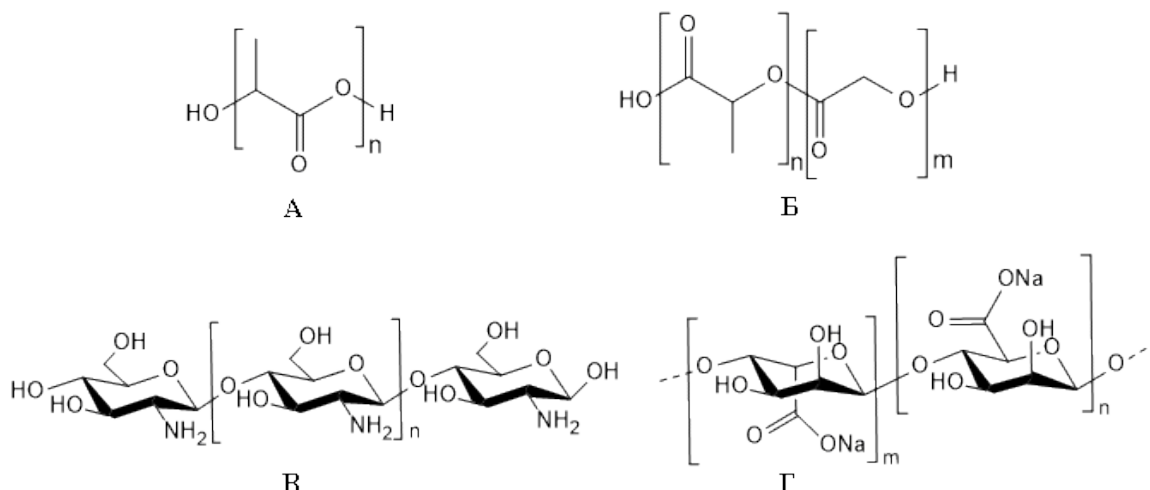


Рисунок 2 – Химическая структура некоторых полимеров, применяемых для получения наночастиц: (А) полилактиды – PLA; (Б) сополимеры молочной и гликолевой кислот – PLGA; (В) хитозан; (Г) альгинат натрия

Перспективность применения наночастиц на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров, таких как сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLA / PLGA), как систем доставки широкого спектра ЛВ: противоопухолевых веществ, антибиотиков, антисептиков, противовоспалительных веществ, антиоксидантов, белков и нуклеиновых кислот) показана в многочисленных исследованиях [32-34].

Сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA) используется в составе многих одобренных FDA лекарственных препаратов с модифицированным высвобождением, среди которых микросферы (Vivitrol®, Lupron Depot®, Sandostatine LAR®, Risperdal Consta®, Trelstar®, Bydureon®) и имплантаты *in situ* (Eligard®, Sublocade®) [35]. Сополимеры молочной и гликолевой кислот отличаются низкой токсичностью, высокой биосовместимостью и способностью к биodeградации, что обуславливает их широкое применение при разработке систем адресной доставки и депо-форм [36].

В настоящее время накоплен значительный опыт в разработке НЛФ на основе PLGA для терапии злокачественных новообразований и изучении их физико-химических, биофармацевтических и биологических свойств [37]. Интерес к разработке НЛФ на основе PLGA с каждым годом растет: за последние 25 лет в базе данных PubMed (Medline) по запросу «PLGA nanoparticles» индексируется 4939 статей (рисунок 3).

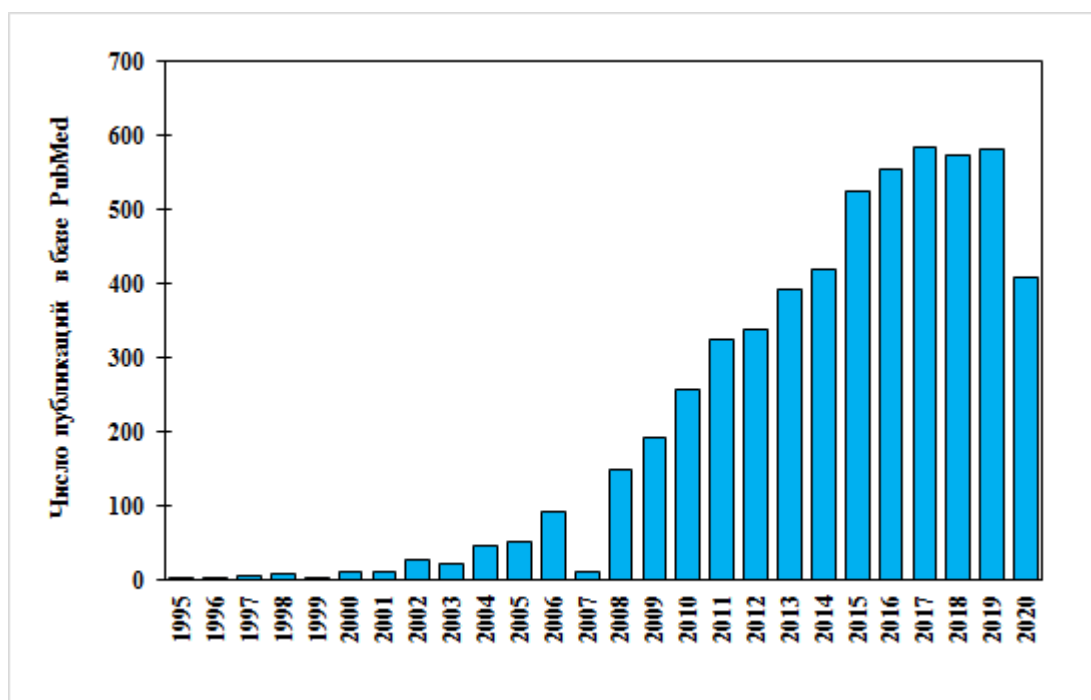


Рисунок 3 – Динамика роста числа публикаций (в год) по запросу «PLGA nanoparticles» в базе данных PubMed (1995-2020)

На сегодняшний день несмотря на наличие весомых доказательств в пользу перспективности применения полимерных систем доставки лекарств для диагностики и терапии ряда заболеваний, в том числе злокачественных новообразований и болезней ЦНС, всего 15 ЛФ (микросферы, имплантаты) на основе PLA / PLGA одобрены FDA к медицинскому применению в США [38; 39]. Тем не менее, PLGA является весьма перспективным полимером для получения наноразмерных систем доставки ЛВ для внутривенного введения.

Далее необходимо рассмотреть предпосылки к созданию наноразмерных лекарственных форм, в том числе на основе полимеров, для противоопухолевой терапии.

### 1.3. Наноразмерные системы доставки лекарственных веществ для противоопухолевой терапии

Использование полимерных НЧ в качестве носителей позволяет изменить биораспределение ЛВ. При введении в кровь полимерные НЧ, как и другие частицы – эндогенные (например, погибшие клетки) или экзогенные (например, бактерии) - подвергаются опсонизации, то есть на их поверхности адсорбируются белки плазмы крови, образуя так называемую «белковую корону» [40-42]. Корона состоит в основном из «опсонинов» - белков, способствующих фагоцитозу. К опсонинам относятся промежуточные продукты активации

системы комплемента (C3b, C4b, iC3b), иммуноглобулины (IgG, IgM), фибронектин, С-реактивный белок. В состав «короны» могут входить также «дисопсонины»: альбумин, липопротеины и другие минорные компоненты плазмы. Согласно современным представлениям корона состоит из двух слоев: жесткой короны (hard corona) — молекул белка, прочно связанных с наночастицей, и мягкой короны (soft corona), состоящей из слабо связанных молекул белка, находящихся в динамическом равновесии с раствором. Свойства поверхности наночастиц влияют на состав белковой короны, который в свою очередь определяет их дальнейшую судьбу: скорость выведения из организма, интернализация в клетки определенного типа, распределение между органами [43].

Опсонизированные наночастицы распознаются и захватываются путем эндоцитоза макрофагами – клетками системы мононуклеарных фагоцитов (макрофаги печени, селезенки и костного мозга и циркулирующие моноциты), одной из основных функций которых является уничтожение чужеродных частиц. Помимо фагоцитоза, существует еще четыре основных механизма интернализации наночастиц в эукариотические клетки: макропиноцитоз, клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-опосредованный эндоцитоз и клатрин- и кавеолин-независимый эндоцитоз. В некоторых источниках эти механизмы рассматриваются в качестве подтипов процесса пиноцитоза [44; 45].

Большая часть дозы внутривенно введенных наночастиц аккумулируется в печени, которая содержит основную популяцию резидентных макрофагов (купферовских клеток), имеющих непосредственный контакт с кровью. В крови опсонины взаимодействуют с наночастицами посредством электростатических, ионных, Ван-дер-Ваальсовых, и гидрофобных/гидрофильных сил взаимодействия. Таким образом, поверхностные свойства наноразмерных носителей играют ключевую роль в процессе опсонизации. Гидрофобные и заряженные частицы сильнее подвергаются опсонизации по сравнению с гидрофильными и нейтральными частицами [46], и поэтому быстро выводятся из кровяного русла, в то время как частицы с более гидрофильной поверхностью адсорбируют меньше опсонинов и способны длительно циркулировать в кровотоке. Гидрофобные НЧ, которые будут активно накапливаться в макрофагах, расположенных в селезенке, лимфатических узлах и лёгких, можно использовать для терапии внутриклеточных инфекций (например, сальмонеллёз [47; 48], бруцеллёз [49]), когда макрофаги являются нишей для выживания бактерий.

При этом наночастицы с гидрофильной поверхностью, способные избегать захвата макрофагами, способны длительно циркулировать в кровотоке. Такие носители способны снизить клиренс ЛВ, способствовать длительному поддержанию в крови терапевтической концентрации. Для повышения времени циркуляции НЧ в кровотоке используют технологию «стелс» (*от англ. stealth*), позволяющую НЧ избегать распознавания

клетками иммунной системы, в том числе и макрофагами. Суть технологии заключается в создании гидрофильной оболочки НЧ, которая создаёт стерический барьер, препятствующий адсорбции опсоинов на поверхности НЧ и позволяет НЧ избежать захвата макрофагами, продлевая таким образом время их циркуляции в кровотоке. Теоретические и технологические принципы, лежащие в основе создания НЧ типа «стелс», изложены в обзорах S. M. Moghimi и соавт. [50].

Длительно циркулирующие наноразмерные носители обычно получают путем покрытия поверхности частицы полимером, который придает системе «стелс» свойства. Термин «стелс», заимствованный из военной технологии и означающий «снижение заметности», в медицине и биологии применяют к наночастицам, обладающим способностью избегать распознавания иммунными клетками организма. Наиболее распространёнными способами гидрофилизации поверхности НЧ являются ковалентная пришивка к поверхности частиц цепей полиэтиленгликоля (ПЭГ) различной молекулярной массы, использование ПЭГилированных производных полимеров, формирующих ядро НЧ, или покрытие поверхности НЧ неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ), которые также содержат фрагменты ПЭГ. ПЭГ является наиболее изученным агентом для получения «стелс» наноразмерных носителей. Этот нейтральный, гибкий и гидрофильный полимер может создавать барьер, который снижает адгезию опсоинов, находящихся в крови, к наночастицам, делая последние «невидимыми» для клеток-фагоцитов [51; 52].

Наиболее распространёнными ПАВ, который используются для получения стелс-НЧ, являются блоксополимеры полиэтиленоксида (PEO) и полипропиленоксида (PPO), в том числе полуксамеры – линейные триблоксополимеры типа PEO-PPO-PEO (выпускаются под торговыми марками Pluronic®, Lutrol®, Kolliphor®) и полуксамины – X-образные сополимеры (Tetronic®) (рисунок 4). Среди наиболее эффективных стелс-агентов следует отметить полуксамер 407 и полуксамин 908 [53]. Модификация поверхности с помощью полуксамеров и полуксаминов обеспечивает длительную циркуляцию в крови различных полимерных наночастиц, в том числе наночастиц из полистирола и PLGA [54]. Таким образом, положительный вклад полимерного покрытия наночастицы в приобретение свойств «стелс» состоит, в основном, в возможности гидрофильной полимерной оболочки создавать физический барьер, препятствующий распознаванию адсорбированных опсоинов макрофагами, что способствует увеличению времени циркуляции носителя в кровотоке.

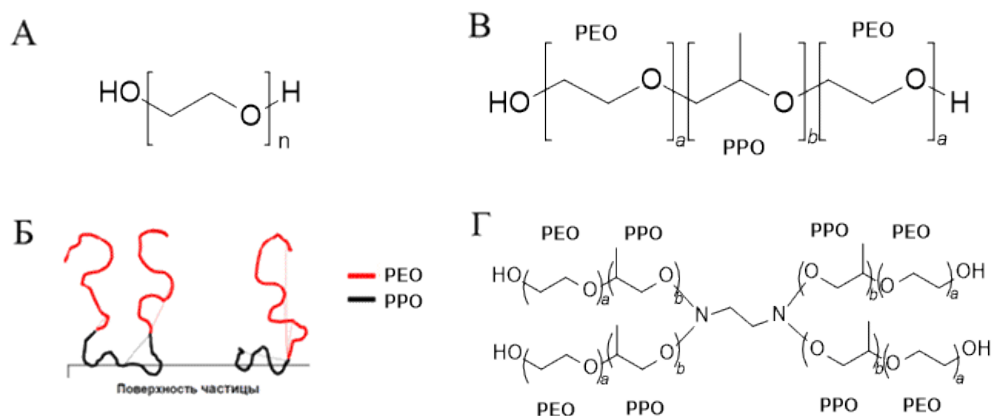


Рисунок 4 – Способы гидрофилизации поверхности наночастиц. А – полиэтиленгликоль (ПЭГ); Б – взаимодействие блоксополимеров полиэтиленоксида (РЕО) и полипропиленоксида (РРО) с поверхностью наночастиц; В – полуксамеры; Г – полуксаминны

Наиболее значительная часть работ, посвященных исследованиям в области наносомальных систем доставки, относится к химиотерапии злокачественных новообразований. Для этого существует ряд предпосылок. Основной проблемой лечения онкологических заболеваний являются серьезные побочные эффекты противоопухолевых препаратов, используемых для химиотерапии. Известно, что лишь 1% таких препаратов в результате их введения в организм больного достигает конечной цели – опухолевых клеток, в то время как остальная часть оказывает токсическое воздействие на здоровые ткани [55]. В связи с этим одним из самых перспективных направлений использования наночастиц стала разработка систем направленной (адресной) доставки лекарственных веществ для терапии онкологических заболеваний.

Профили распределения НЧ в здоровом организме и в условиях патологии существенно различаются, этим и обеспечивается относительная «избирательность» их действия. В здоровом организме внутривенно введенные НЧ могут проникнуть из сосудистого русла в ткани только там, где встречаются фенестрированные или синусоидные капилляры, например, в печени или селезенке, при этом, доступ НЧ в другие ткани ограничен ввиду низкой проницаемости остальных сосудов. В то же время, сосуды, питающие солидные опухоли, отличаются повышенной проницаемостью, обусловленной увеличением расстояния между эндотелиальными клетками, выстилающими внутреннюю стенку сосудов и дезорганизацией сосудистой стенки. Повышенная проницаемость, наблюдаемая в сосудистой сети тканей, подвергающихся определенным патологиям, таким как опухоль или воспаление, является результатом нерегулируемого ангиогенеза и / или повышенной экспрессии и активации факторов проницаемости сосудов, таких как таких как брадикинин, оксид азота. Дисбаланс в

экспрессии и активации проангиогенных и антиангиогенных молекул приводит к формированию прерывистых капилляров, в которых фенестры между эндотелиальными клетками могут иметь размер от 0,3 до 4,5 мкм [56]. Кроме того, в зонах опухолевого роста часто нарушен отток лимфы вследствие нарушения лимфангиогенеза и сдавления лимфатических сосудов растущим числом опухолевых клеток. В результате этого вещества, присутствующие в интерстициальной жидкости опухолей, сохраняются дольше, чем в нормальных тканях, в которых функция лимфатической системы не нарушена (рисунок 5). Эти особенности опухолей способствуют проникновению и накоплению там НЧ. Это явление было впервые описано Н. Maeda в 1989 году для макромолекулярных пролекарств и получило название эффекта «повышенной проницаемости и удерживания» (от *англ.* Enhanced Permeation and Retention (EPR) Effect) [57]. Со временем эффект EPR лёг в основу концепции пассивной доставки ЛВ в солидные опухоли при помощи макромолекулярных и коллоидных носителей, широко распространённой и в настоящее время. Эффект EPR стал своего рода краеугольным камнем в разработке противоопухолевых препаратов с использованием макромолекулярных носителей, включая доставку генов, молекулярную визуализацию, иммунотерапию, доставку лекарств при помощи мицелл, липосом и белково-полимерных конъюгатов [58].



Рисунок 5 – Эффект повышенной проницаемости и удерживания наночастиц и макромолекул в опухоли (эффект EPR)

Для повышения эффективности транспорта НЧ в опухоль целесообразно использовать НЧ, способные длительно циркулировать в кровотоке, то есть «stealth-НЧ». Впервые технология «стелс» была применена для создания длительно циркулирующих ПЭГилированных липосом. Примером ее успешного практического использования является противоопухолевый антибиотик доксорубин, включенный в ПЭГилированные липосомы

(препараты Caelyx® / Doxil®) [59].

Таким образом, пассивная доставка обеспечивает проникновение наночастиц и их накопление в опухоли благодаря эффекту EPR-эффект, который возникает из-за избыточного разрастания сосудов (ангиогенеза), вызванного потребностью опухоли в кислороде и питании. При этом новообразованные капилляры опухолевой ткани обладают повышенной проницаемостью по сравнению с капиллярами всего организма, что способствует избирательному проникновению наночастиц, а нарушение оттока лимфы способствует удерживанию НЧ в ткани опухоли. Тем не менее, стратегия пассивной доставки ЛВ в опухоль посредством эффекта EPR зачастую не является эффективной. На основании недавно проведенного мета-анализа можно заключить, что только небольшой процент (менее 1%) от введенной дозы «пассивно» доставляемых наноносителей накапливается в опухолях-ксенотрансплантатах [60], что может быть связано с физиологическими барьерами и гетерогенностью опухоли. Кроме того, значительная часть наночастиц захватываются и выводятся клетками системы мононуклеарных фагоцитов, часть физически «застревает» в синусоидах печени или поглощается гепатоцитами и клетками Купфера. Поэтому внимание исследователей в последние 10 лет было сосредоточено на стратегиях активной доставки для повышения накопления наночастиц в опухоли.

Активная доставка ЛВ достигается за счет модификации носителей, содержащих химиотерапевтические средства, посредством присоединения векторов – молекул, которые способны специфически связываться с рецепторами на клетках-мишенях. Подходы к созданию наночастиц для активной доставки ЛВ подробно освещены в обзорах [61-65]. Важно отметить, что несмотря на большое количество разработанных подходов, ни один противоопухолевый препарат направленного (таргетного действия) в настоящее время не прошел все стадии клинических испытаний и не был одобрен для медицинского применения. Отчасти это связано с тем, что многие проблемы, связанные с проникновением в опухоль, гетерогенностью опухоли, гипоксией и эндоцитозом, не удалось преодолеть. Кроме того, часто наночастицы векторизуют каким-либо лигандом к какому-то одному специфическому рецептору на поверхности клетки-мишени, при этом популяции клеток, не экспрессирующие данный рецептор выживают, пролиферируют, что приводит к возникновению резистентности опухоли к данной терапии. Также, иногда при взаимодействии векторизованной наночастицы с плазмой крови происходит адсорбция белков на поверхности наночастицы и может произойти экранирование лиганда, что приводит к невозможности взаимодействия со специфическим рецептором на поверхности клетки-мишени и, соответственно, невозможности интернализации наночастицы. Более того, в процессе интернализации наночастицы путем рецептор-опосредованного эндоцитоза может происходить нежелательная деградация ЛВ внутри эндосом, что является критическим

процессом, например, для нуклеотидов и белков, если их внутриклеточная мишень находится в цитоплазме [66]. Несмотря на то, что векторизация повышает селективность взаимодействия наночастиц с целевыми клетками, носитель все равно должен предварительно эффективно доставляться к целевым клеткам без потери лекарственного вещества в процессе транспорта. Поэтому дополнительным препятствием, которое ограничивает терапевтическую эффективность векторизованных наночастиц является преждевременное и неспецифическое высвобождение инкапсулированного лекарственного вещества. В связи с этим привлекательным подходом к повышению эффективности доставки было создание носителей, способных высвобождать ЛВ при воздействии определенных стимулов [67].

Однако, многие нано-препараты не прошли клинические испытания, потому что они не смогли продемонстрировать значительное улучшение эффективности по сравнению со стандартной терапией. Если рассматривать противоопухолевую терапию, то эффективность в доклинических исследованиях (на животных моделях) может быть невероятной, а при терапии опухолей у человека разница почти сводится к нулю. Кроме того, проявляется токсичность, связанная с самим носителем. На сегодняшний день в клинической практике применяют 15 нано-препаратов для терапии опухолей, принцип действия которых заключается в пассивной доставке ЛВ веществ в опухоль посредством эффекта ERP. Эти нано-препараты демонстрируют улучшенный токсикологический профиль по сравнению с традиционными формами, однако данные о их преимуществах в эффективности неоднозначны [68]. В то же время общее число клинических исследований (КИ) нано-препаратов в области онкологии постоянно возрастает (по данным базы *clinicaltrial.gov* в 2019 году зарегистрировано 190 исследований). При этом показатели успешности клинических испытаний 1, 2 и 3 фазы снижаются от 94% до 48% и до 14%, соответственно, из-за недостаточной эффективности и большей токсичности нано-препаратов [69]. Недостаточное понимание взаимодействия наночастиц с биологическими мишенями, отсутствие накопления наночастиц в опухоли посредством EPR эффекта, неадекватная фармакокинетика, недостаточная надежность *in vivo* модели в экспериментах на животных на стадии фармацевтической разработки и доклинических исследований является одной из причин, препятствующих успешному прохождению клинических испытаний.

Таким образом, можно выделить преимущества использования наноразмерных форм противоопухолевых агентов, по сравнению со стандартными лекарственными формами. Как было сказано выше химиотерапия, которая является классическим способом лечения рака, имеет тяжелые побочные эффекты вследствие того, что ее токсичное действие направлено на все клетки организма, в том числе и на здоровые. Направленная доставка непосредственно к месту расположения опухоли, которую могут обеспечить многие типы наночастиц, является решением этой проблемы. Главная особенность наночастиц – их размер (10-1000 нм): они

слишком велики, чтобы свободно проникать через эндотелиальные клетки стенки капилляров нормальных тканей организма, в отличие от малых молекул, которые после внутривенного введения могут быстро покидать кровяное русло и распределяться во все ткани. В то же время капилляры опухоли имеют большие промежутки (фенестры) между эндотелиальными клетками, через которые НЧ могут проникнуть, удерживаясь затем в тканях опухоли из-за нарушения оттока лимфы (EPR-эффект). Вследствие избирательного действия здоровые клетки пациента останутся нетронутыми. Таким образом, побочный эффект химиотерапии будет снижен. Тем не менее, наноразмерные носители при попадании в кровь могут вызывать иммунный ответ, захватываться макрофагами и выводиться из кровяного русла в органы ретикуло-эндотелиальной системы (печень, легкие, селезенка). Именно размер, заряд и морфология поверхности НЧ решает их «судьбу» в организме. Возможность использования носителя, обеспечивающего пассивную или активную доставку ЛВ в целевые ткани, является неоспоримым преимуществом использования наночастиц в химиотерапии по сравнению со стандартными лекарственными формами.

#### **1.4. Системы доставки доксорубина на основе наночастиц: фармакокинетика, эффективность и безопасность**

Одной из успешных стратегий снижения кардиотоксичности доксорубина и, соответственно, увеличения его терапевтического индекса, было создание липосомальных форм доксорубина, позволивших изменить фармакокинетику и биораспределение доксорубина: снизить величину пиковых концентраций доксорубина в плазме, продлить время циркуляции (снизить клиренс) и уменьшить накопление доксорубина в кардиомиоцитах. Поскольку внутривенно введенные липосомы не могут покидать кровеносное русло и проникать в ткани, где встречаются непрерывные капилляры (с плотным межклеточным соединением эндотелиальных клеток), такие как сердечная мышца и желудочно-кишечный тракт, снижается накопление доксорубина в сердечной мышце и, соответственно, кардиотоксичность и токсичность в отношении ЖКТ.

Doxil® / Caelyx® – лекарственные препараты доксорубина, заключенного в ПЭГилированные (покрытые полиэтиленгликолем) липосомы [70; 71]. Липосомальный доксорубин (Doxil®) был первым одобренным FDA нано-препаратом (1995) для лечения пациентов со саркомой Капоши, раком молочной железы и яичников, связанных со СПИДом. За пределами США Doxil® известен как Caelyx® (одобрен ЕМА в Европе в 1996). Принцип его действия заключается в увеличении времени циркуляции ЛВ и предотвращении захвата

макрофагами ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) из-за включения в состав ПЭГилированных липосом. Благодаря эффекту EPR (эффект повышенной проницаемости и удерживания), Doxil® «пассивно» доставляется в клетки опухоли, где доксорубицин высвобождается, что обеспечивает более высокую концентрацию доксорубицина в опухолевой ткани, чем в нормальных тканях. За счёт изменения биораспределения снижается специфическая токсичность: для аналога данных ПЭГилированных липосом (Caelyx®) показана существенно меньшая кардиотоксичность по сравнению со свободным доксорубицином, поскольку липосомы не проникают в кардиомиоциты. Исследование фармакокинетики и эффективности ПЭГилированной липосомальной формы доксорубицина на интракраниальной модели рака молочной железы у крыс показало уменьшение негативного влияния доксорубицина на перекисное окисление липидов и активность антиоксидантной защиты в тканях почек, что обеспечило снижение нефротоксичности доксорубицина [72].

Тем не менее, несмотря на значительное снижение кардиотоксичности и токсичности в отношении ЖКТ, противоопухолевая эффективность была сопоставима с эффективностью свободного доксорубицина [73; 74]. Кроме того, за счёт покрытия липосом ПЭГ, создаются высокие концентрации доксорубицина в коже, что вызывает ладонно-подошвенный синдром (эритродизестезия), сопровождающийся покраснением, болезненностью и шелушением кожи, иногда приобретающей при этом оранжевую окраску [75]. Проявление данного вида токсичности приводит к вынужденному снижению максимальной переносимой однократной дозы (МПД) по сравнению с доксорубицином в свободном виде: 50 мг/м<sup>2</sup> каждые 4 недели (12,5 мг/м<sup>2</sup> в неделю) vs 60 мг/м<sup>2</sup> каждые 3 недели (20 мг/м<sup>2</sup> в неделю), соответственно [76].

Myocet®, представляющий собой доксорубицин, включенный в неПЭГилированные липосомы, с 1996 г. применяют в Европе и Канаде для лечения метастатического рака молочной железы в сочетании с циклофосфамидом [77]. Принцип действия данной формы такой же, как у ПЭГилированных форм [78-81], однако отсутствие ПЭГ на поверхности липосом устраняет проявление ладонно-подошвенного синдрома без потери эффективности и безопасности формы. Фармакокинетика данной формы, тем не менее, отличается от фармакокинетики ПЭГилированных форм более быстрым выведением из кровотока. Например, при исследовании фармакокинетики в плазме крови при однократном внутривенном введении доксорубицина, липосомальной формы доксорубицина (Myocet®) и модифицированной ПЭГ липосомальной формы доксорубицина (Doxil®) мышам в дозе 5 мг/кг, было отмечено повышение общей концентрации доксорубицина в плазме при его включении в состав липосом (Myocet®), за счёт того, что включенный в липосомы доксорубицин не может, в отличие от свободного, быстро покинуть кровяное русло. При этом содержание липосомального доксорубицина (Myocet®) в крови примерно через 17-20 часов после введения становилось

таким же, как при введении раствора доксорубина. Это свидетельствовало о захвате липосом клетками РЭС и выведению из кровотока. При этом гидрофилизация поверхности липосом ПЭГ позволила не только повысить максимальную концентрацию доксорубина в плазме крови (как в случае немодифицированных липосом, Myocet®), но и существенно продлить время циркуляции в кровотоке, поскольку цепи ПЭГ на поверхности липосом препятствуют захвату клетками РЭС и распределению липосом в печень и селезенку [82].

Данные доклинической и клинической фармакокинетики липосомальных форм Doxil® / Caelyx® [83-86] и Myocet® [87; 88] позволили выявить различия во времени циркуляции фракции доксорубина, связанной с липосомами, а также различия в фармакокинетических параметрах «общего» (свободный + носитель) фракции доксорубина. Так, в результате исследования фармакокинетики Myocet® в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> у 18 пациентов в возрасте 20-30 лет с солидными опухолями были получены следующие результаты: клиренс составил 5,6 л/ч/м<sup>2</sup>, суммарный объем распределения 82 л/м<sup>2</sup>, T<sub>1/2</sub> – 52,6 ч. При этом на основании значений C<sub>max</sub> и AUC для общего и инкапсулированного в липосомы доксорубина можно заключить, что около 85% циркулирующего доксорубина было связано с липосомами [87]. Результаты другого исследования фармакокинетики Myocet® в дозе 60 мг/м<sup>2</sup> у пациентов с гистологически или цитологически подтвержденным раком молочной железы также продемонстрировали увеличение общей концентрации доксорубина в плазме, снижение общего клиренса (в 9 раз), уменьшение объема распределения (в 25 раз) по сравнению параметрами, полученными при введении свободного доксорубина (60 мг/м<sup>2</sup>) в комбинации с циклофосфамидом (600 мг/м<sup>2</sup>). При этом около 80% циркулирующего доксорубина было инкапсулировано в липосомы. Что касается периода полувыведения, Swenson С. Е. и соавт. отмечают, что период полувыведения носителя (t<sub>1/2</sub>), характеризующий, вероятно, элиминацию из кровотока и аккумуляцию липосом в тканях, составил 16,43 ч [88].

ПЭГилированная липосомальная форма продемонстрировала увеличение времени циркуляции и снижение клиренса по сравнению с Myocet® и свободным доксорубином. Фармакокинетическое исследование Doxil® по сравнению со свободным доксорубином у пациентов с солидными опухолями для двух уровней доз (25 и 50 мг/м<sup>2</sup>) продемонстрировало увеличение T<sub>1/2</sub> (45 ч vs 2 ч), снижение клиренса (0,1 л/ч vs 45 л/ч) и уменьшение объема распределения (4 л vs 254 л), соответственно. При этом ≈ 100% циркулирующего доксорубина было инкапсулировано в липосомы [89]. В ходе фармакокинетического изучения профиля Doxil® у пациентов с метастатическим раком молочной железы показано, среднее значение клиренса составило 40 мл/ч, T<sub>1/2</sub> – 79 ч [90].

Результаты недавно проведенного мета-анализа результатов рандомизированных клинических исследований эффективности и безопасности липосомальных форм

доксорубицина свидетельствуют о более благоприятном профиле токсичности (низкая кардиотоксичность, миелосупрессия, аппендцея, тошнота, рвота) и более высоком терапевтическом индексе по сравнению со стандартной формой, что делает липосомальные формы предпочтительными у пожилых пациентов, пациентов с факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и пациентов, ранее принимавших антрациклины [91].

Помимо липосомальных форм, описаны результаты клинических исследований наноразмерной формы доксорубицина, включенного в мицеллы на основе неионогенных блок-сополимеров: полуксамеров Pluronic® L61 и Pluronic® F127. Фармакокинетика была изучена у разных групп пациентов с прогрессирующими резистентными солидными опухолями. Исследование I фазы у 26 пациентов с прогрессирующим раком, проведенное с целью изучения фармакокинетического профиля с эскалацией дозы от 5 до 90 мг/м<sup>2</sup>, показало, что для данной формы характерны линейный характер увеличения  $C_{max}$  от AUC, замедленный клиренс по сравнению с традиционной формой доксорубицина; при этом МПД составила 70 мг/м<sup>2</sup>, лимитирующая токсичность проявлялась при дозе 90 мг/м<sup>2</sup> [92].

Существенно снизить токсичность доксорубицина в отношении здоровых клеток позволяет применение термочувствительных липосом: после внутривенного введения липосомального препарата доксорубицина (ThermoDox®) происходит пассивная доставка в ткань опухоли посредством эффекта EPR, а затем опухоль прогревают ультразвуком до температуры 40-50 °С, при этом создаются отверстия в липосоме, через которые доксорубицин высвобождается непосредственно внутрь и вокруг целевой опухоли. При этом при нагревании кровеносные сосуды в опухолях становятся еще более проницаемыми, еще больше увеличивая накопление липосом в опухолях до высвобождения доксорубицина. На животных моделях было показано, что ThermoDox® доставляет в опухоль в 25 раз больше доксорубицина, чем при внутривенной инфузии в свободной форме, и в 5 раз больше доксорубицина, чем при введении стандартных липосомальных препаратов доксорубицина [93].

Снижение специфической токсичности за счет изменения биораспределения было показано не только для липосом, но и для полимерных наночастиц. В исследовании Трещалина И. Д. и соавт. наносомальная форма доксорубицина на основе НЧ полибутилцианоакрилата, модифицированных полисорбатом 80, продемонстрировала меньшую кардио- и тестикулярную токсичность по сравнению со стандартным препаратом [94].

С помощью наноразмерных носителей может быть повышена эффективность химиотерапии опухолей, расположенных в органах РЭС. Накопление фагоцитированных наночастиц в органах РЭС может быть использовано для селективного лечения болезней, поражающие эти органы, таких как гепатокарцинома. Например, ПАЦА НЧ с доксорубицином, размером 200-300 нм показали высокое накопление в клетках Купфера печени, из которых

постепенно высвобождался доксорубицин при деградации частиц; при введении мышам такие НЧ продемонстрировали снижение системной токсичности по сравнению со свободной формой препарата, что проявляется в более длительной выживаемости животных и отсутствии атрофии органов [95; 96]. Эта наноразмерная форма уже ранее находилась на стадии клинических испытаний под названием Transdrug® (Bioalliance) [97; 98]. Однако, биотехнологическая компания Onxeo SA (Euronext Paris, NASDAQ Copenhagen: ONXEO), специализирующаяся на разработке инновационных препаратов для лечения орфанных заболеваний, в частности онкологии, в 2017 году объявила результаты исследования III фазы ReLive Livatag® (доксорубицин Transdrug™) у взрослых пациентов с неоперабельной гепатоцеллюлярной карциномой, непереносимостью сорафениба или прогрессированием после системной терапии, включающей сорафениб, по сравнению с лучшим стандартом медицинской помощи. При этом было показано, что наносомальный доксорубицин не продемонстрировал большей эффективности по сравнению с контрольной группой (плацебо-контролируемое исследование). Данный пример демонстрирует, что высокая эффективность нано-препаратов в доклинических исследованиях не всегда соответствует большей эффективности в клинических исследованиях по сравнению со стандартной терапией. Для одобренных к медицинскому применению нано-препаратов, в том числе, наноразмерных форм доксорубицина, для лечения злокачественных новообразований было характерно именно снижение токсичности посредством изменения биораспределения, а не увеличение эффективности.

Что касается второго поколения нано-препаратов (таргетного действия), то среди одобренных в клинике пока нет ни одного препарата с активным нацеливанием. Однако некоторые препараты находятся на стадии клинических исследований. Так, липосомальная форма доксорубицина, векторизованная анти-HER2 (MM-302) представляет собой липосомы из дистеароилфосфатидилэтаноламина (DSPE), покрытые ПЭГ [99]. Данные липосомы векторизованы при помощи одноцепочечного анти-HER2 антитела (scFv). Было показано, что данная форма в сочетании с терапией моноклональными антителами (Трастузумаб) способна взаимно усиливать противоопухолевый эффект [100]. Трастузумаб, как известно, представляет собой моноклональное антитело с полной цепью, которое селективно взаимодействует с внеклеточным доменом рецептора эпидермального фактора роста второго типа (HER2) на поверхности злокачественных клеток и тормозит их пролиферацию. Кроме того, на фазе клинических исследований находятся два липосомальных препарата для генной терапии рака, нацеленные на рецептор трансферрина: SGT-53 и SGT-94 [99].

Известно, что мозг является одним из наименее доступных объектов фармакотерапии из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Функция ГЭБ заключается в защите мозга от проникновения чужеродных веществ, бактерий, вирусов, токсинов, поддержание гомеостаза и

высокоселективном транспорте в мозг питательных веществ и кислорода. ГЭБ образован эндотелиоцитами капилляров и базальной мембраной, к которой со стороны ткани мозга прилежат перициты и астроциты (рисунок 6).

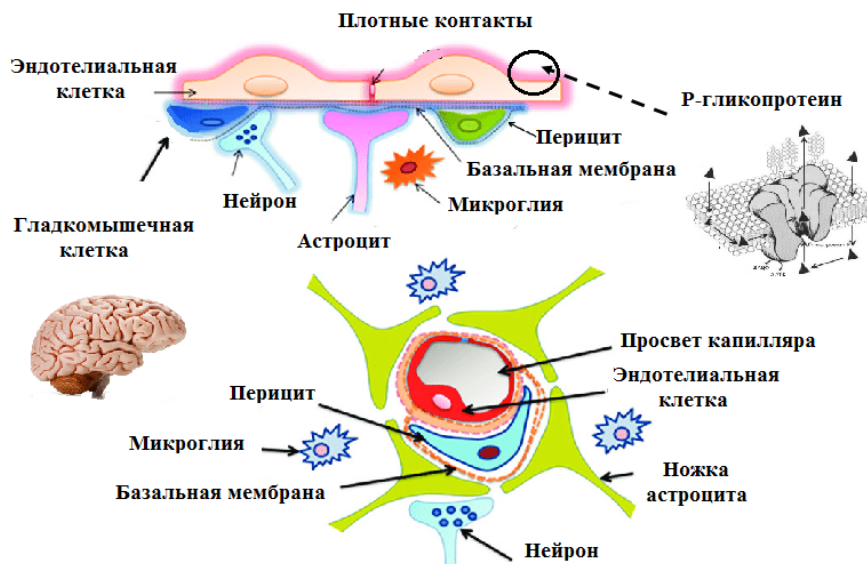


Рисунок 6 – Структура ГЭБ. Особенности строения капилляров мозга

Проникновение ЛВ в мозг в большей степени зависит от способности биологически активных молекул пересекать липидные мембраны, препятствующие прохождению полярных веществ. Кроме того, трансмембранные белки семейства АВС-транспортеров (Р-гликопротеин), локализованные в эндотелиоцитах ГЭБ, способствуют выбрасыванию многих ксенобиотиков, в том числе ЛВ (если они являются их субстратами) из эндотелиоцитов обратно в кровоток, тем самым ограничивая проникновение их в ткани мозга [101; 102]. Одним из перспективных методов доставки ЛВ в мозг является использование наноносителей (в основном коллоидных носителей), липосом и полимерных наночастиц, а также твердых липидных наночастиц, полимерных мицелл и дендримеров, способных доставлять ЛС и макромолекулы в мозг. Важно, что наноносители с модифицированной поверхностью способны обеспечивать транспорт ЛВ через ГЭБ посредством механизмов, недоступных для малых молекул. Специфическим механизмом транспорта макромолекул является транцитоз через эндотелиальные клетки ГЭБ. Возможны различные виды транцитоза: рецептор-опосредованный транцитоз (инсулин, лептин, цитокины, вирусы) и транцитоз, опосредованный абсорбцией (белки плазмы, в том числе альбумин). В первом случае макромолекула взаимодействует со специфическим рецептором на поверхности эндотелиальной клетки, что приводит к эндоцитозу комплекса макромолекула – рецептор. Далее этот комплекс интернализуется эндотелиальную клетку, а затем макромолекула путем экзоцитоза выделяется через противоположную мембрану клетки.

Данный механизм характерен для трансферрина, лактоферрина, аполипопротеина Е, инсулина, лептина, эпидермального фактора роста [103]. Возможные механизмы доставки ЛВ в мозг при помощи наночастиц подробно изложены в обзорах [104-106].

Несмотря на то, что был достигнут прогресс в лечении опухолей головного мозга, таких как мультиформная глиобластома, двухлетняя выживаемость менее 25% [107] и высокая токсическая нагрузка, связанная с химиотерапией, требуют разработки новых стратегий доставки лекарств. Доксорубин является противоопухолевым препаратом широкого спектра действия, потенциально активным в отношении глиобластомы [108; 109]. Однако при внутривенном введении его концентрации в интракраниальных опухолях не достигают терапевтического уровня в связи с активностью Р-гликопротеина (Р-gp), субстратом которого является доксорубин [110]. В связи с данным ограничением, усилия многих исследователей в настоящее время направлены на создание наноразмерных систем доставки доксорубина (липосомы, полимерные НЧ и др.), которые могли бы преодолевать ГЭБ и эффективно доставлять доксорубин в мозг [111; 112].

В настоящее время интерес к доксорубину как противоопухолевому агенту (в том числе к его липосомальной форме) для лечения опухолей ЦНС остается весьма высоким, о чем свидетельствует ряд идущих и недавно завершенных клинических исследований у пациентов с глиобластомой. Предпосылками к этому являются результаты немногочисленных исследований *in vitro* / *in vivo*, доказывающих возможность преодоления ГЭБ путем включения доксорубина в наноразмерные лекарственные формы. ПЭГилированная липосомальная форма доксорубина в преклинических исследованиях на модели вторичной опухоли головного мозга у крыс продемонстрировала большее накопление в ткани мозга и бо́льшую эффективность по сравнению со свободной формой доксорубина. Так, через 48 ч после введения липосомальной формы в дозе 6 мг/кг содержание доксорубина в опухоли было в 14 раз выше, чем после введения свободного доксорубина; через 120 ч – в 9 раз выше, соответственно. В промежутке между 72 и 120 ч после введения наблюдалось повышение концентрации доксорубина в тканях мозга, прилегающих к опухоли (до 4 мг/г). Кроме того, однократное введение липосомальной формы доксорубина в дозе 8 мг/кг на 6 и 11 день после имплантации опухоли приводило к увеличению продолжительности жизни (УПЖ) на 168 % по сравнению с контролем, в то время как введение доксорубина в свободной форме было эффективно только на 6 день (УПЖ – 135 %) [113]. В исследовании Sharma U. S. и соавт. также было продемонстрировано увеличение продолжительности жизни крыс с интракраниальной глиобластомой 9L на 29 % при трехкратном еженедельном внутривенном введении липосомальной формы доксорубина в суммарной дозе 17 мг/кг по сравнению с контролем без лечения; при этом введение свободного доксорубина в той же дозе приводило к

снижению продолжительности жизни по сравнению с контролем. Было отмечено накопление флуоресцентно-меченных липосом преимущественно в опухоли, а не в здоровых тканях мозга, при этом распределение было неравномерным – наибольшее накопление наблюдалось в непосредственной близости от кровеносных сосудов опухоли [114]. В другом исследовании также было продемонстрировано преимущественное накопление липосомальной формы доксорубина в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью мозга на модели ортотопических ксенотрансплантатов злокачественной глиомы человека U87 у мышей [115]. Тем не менее, низкая физическая стабильность может препятствовать клиническому применению липосом [116; 117]. Твердые липидные наночастицы также могут быть перспективными носителями для доставки доксорубина в мозг. Так, включение в состав твердых липидных наночастиц улучшало проникновение доксорубина через искусственную модель ГЭБ *in vitro* (монослой эндотелиоцитов капилляров мозга человека, линия hCMEC/D3) [118].

Полимерные наночастицы имеют преимущества перед липосомальными носителями, такие как возможность контролирования кинетики высвобождения ЛВ, широкие возможности модификации поверхности носителя, лучшая фармацевтическая стабильность и др. В связи с этим создание наноразмерных форм на основе полимерных наночастиц для терапии опухолей мозга является перспективным направлением [106]. Механизмы преодоления ГЭБ при помощи полимерных наночастиц рассмотрены в следующем разделе.

### **1.5. Подходы к доставке лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц: роль модификации поверхности НЧ при помощи ПАВ**

Настоящим прорывом области направленного транспорта являлось открытие способности полимерных НЧ, покрытых полисорбатом 80 (Твин 80) преодолевать ГЭБ и доставлять связанные с ними лекарственные вещества в мозг [119]. В экспериментальных работах показано, что включение в НЧ из поли-*n*-бутилцианоакрилата с модифицированной полисорбатом 80 поверхностью (ПБЦА НЧ + ПС 80) веществ, обладающих анальгетической активностью и не способных преодолеть ГЭБ, таких как даларгин [120], лоперамид [121] и эндоморфин [122], приводит к их воздействию на ЦНС, что подтверждается фармакологическими тестами. Возможным механизмом проникновения НЧ, покрытых ПС 80 в мозг является адсорбция аполипопротеинов Е (АроЕ) на поверхности НЧ с последующим взаимодействием с рецепторами к липопротеинам низкой плотности (ЛПНП-рецепторами), экспрессированными в мембранах эндотелиальных клеток капилляров мозга. ЛПНП-рецепторы

воспринимают НЧ как агрегаты липопротеинов низкой плотности, поступающие в мозг из крови. При этом в более ранних работах [119; 21] захват наночастиц опосредованный ЛПНП-рецепторами рассматривается как рецептор-опосредованный эндоцитоз, при этом происходит интернализация НЧ в эндотелиальные клетки и внутри эндотелиальной клетки частица подвергается биодegradации под действием ферментов и выделяет ЛВ, которое затем диффундирует через мембрану в межклеточное пространство и далее проникает в ткани мозга.

Однако в более поздних работах, посвященных транспорту наноносителей через ГЭБ, транспорт НЧ, в том числе опосредованный ЛПНП-рецепторами, рассматривается в основном как рецептор-опосредованный транцитоз (рисунок 7), при котором разрушение НЧ в эндотелиальной клетке не происходит. Эндотелиоциты ГЭБ имеют небольшой размер, поэтому данный процесс более вероятен, чем механизм, связанный с образованием лизосом [123; 124]. Предполагается, что слияние везикулы с лизосомой с последующей деградацией НЧ – не единственный путь; содержимое везикулы может также высвобождаться при слиянии с базолатеральной мембраной (без участия лизосом).

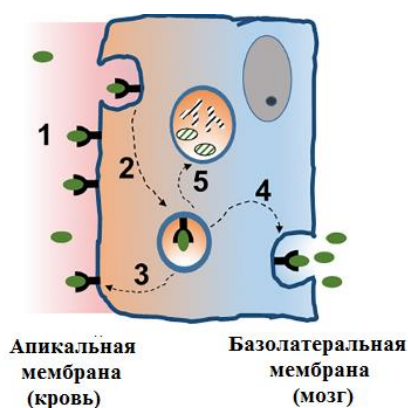


Рисунок 7 – Рецептор-опосредованный транцитоз в ГЭБ. Лиганд связывается с его специфическим рецептором на апикальной мембране эндотелиальной клетки мозга (1), и инициирует инвагинацию плазматической мембраны и процесс эндоцитоза (2). Внутри клетки везикула может следовать различным маршрутам движения, включая рециркуляцию (возвращение) рецептора на апикальную мембрану (3) или слияние везикулы с базолатеральной мембраной с последующим высвобождением содержимого пузырька [транцитоз, (4)]. Кроме того, везикула может направляться к лизосоме (5), где ее содержимое будет подвержено деградации. Адаптировано из *Pulgar V. M. Transcytosis to cross the blood brain barrier, new advancements and challenges //Frontiers in neuroscience. 2019; 12:1019* [124] Copyright © (2019) Pulgar (CC BY 4.0 open access)

Не исключено, что полисорбат 80, сорбированный на поверхности полимерных

наночастиц, оказывает тройное действие: позволяет увеличить время циркуляции наночастиц в крови из-за уменьшения захвата клетками РЭС; стимулирует (опосредованно) рецептор-зависимый транцитоз; оказывает непосредственное влияние на плотные контакты ГЭБ [125; 21]. Доказана эффективность таких НЧ для доставки в мозг противоопухолевых агентов, например, гемцитабина [20] и метотрексата [126; 127], ингибиторов холинэстеразы (прозерин, ривастигмин) [128; 129], антиконвульсантов (вальпроевая кислота) [130]. Разработка наносомальной формы доксорубицина на основе ПБЦА НЧ, покрытых ПС 80, которая показала высокую эффективность в отношении интракраниальной глиобластомы у крыс за счёт преодоления ГЭБ, стала одним из ключевых моментов развития направления «CNS delivery» [131].

Полоксамер 188 также может быть использован для модификации поверхности наночастиц, чтобы обеспечить их транспорт в мозг. Существуют данные, свидетельствующие о роли модификации поверхности наночастиц PLGA полуксамером 188 (Kolliphor® P 188) в обеспечении проникновения доксорубицина через ГЭБ [5]. Ранее также было показано, что поли(бутилцианоакрилатные) НЧ (ПБЦА), покрытые полуксамером 188, значительно усиливают противоопухолевый эффект доксорубицина в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы у крыс. Petri В. и соавт. впервые изучили сорбцию белков плазмы на поверхности ПБЦА НЧ, нагруженных доксорубицином и модифицированных полуксамером 188 или полисорбатом 80 и выяснили, что полуксамер 188, как и полисорбат 80, способствует адсорбции на поверхности НЧ аполилопротеинов А-I (ApoA-I) и Е (ApoE). Авторы предположили, что доставка доксорубицина в мозг с помощью НЧ может быть усилена взаимодействием аполилопротеина ApoA-I, который закреплен на поверхности НЧ, со скавенджер-рецептором класса В типа I (SR-BI), экспрессируемым клетками эндотелиальными клетками капилляров мозга, который участвует в переносе липидов от ApoA-I внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Благодаря этому взаимодействию НЧ проникают в эндотелиоциты путем рецептор-опосредованного эндоцитоза с участием рецепторов липопротеинов низкой плотности (принцип «тroyанского коня»), а затем путем транцитоза в ткани мозга. При этом покрытые полисорбатом 80 или полуксамером 188 ПБЦА НЧ оказывали выраженный противоопухолевый эффект на модели глиобластомы крыс, при этом значительно увеличивали среднюю выживаемость. Таким образом, было показано, что модификация поверхности НЧ полуксамером 188, способствует проникновению ПБЦА НЧ, нагруженных доксорубицином, через ГЭБ [132].

Интересно отметить, что, в ряде более ранних исследований *in vitro* отмечено, что модификация поверхности полимерных НЧ полуксамером 188 не способствует захвату НЧ эндотелиоцитами ГЭБ. Так, Borchard G. и соавт. в эксперименте *in vitro* показали, что

модификация поверхности НЧ из поли(метилметакрилата) (ПММА) поллоксамерами (184, 188, 338, 407) и поллоксамином 908 не способствует эффективному захвату эндотелиальными клетками капилляров мозга: в течение первых 2 часов инкубации концентрации НЧ, в эндотелиальных клетках были на том же уровне, что и в контрольной группе, но значительно увеличивались через 6 часов, что можно объяснить изменениями в клеточных мембранах [133]. Также, при изучении анальгетического эффекта ПБЦА НЧ, нагруженных даларгином, модификация поверхности НЧ поллоксамерами не приводила повышению порога чувствительности, что свидетельствует об отсутствии проникновения данных НЧ через ГЭБ [120]. В противоположность данным результатам, Tröster S. D. и соавт. в эксперименте *in vivo* покрытие ПММА НЧ поллоксамерами 184 и 407 приводило к увеличению концентрации НЧ в эндотелиальных клетках капилляров мозга крыс через 30 мин после введения в 7 раз по сравнению с контролем [134]. Дополнительным фактором, способствующим преодолению ГЭБ, является то, что поллоксамер 188 является ингибитором АВС-транспортеров, препятствующих проникновению многих ЛВ через в опухолевые клетки с множественной лекарственной устойчивостью, а также клетки эндотелия капилляров головного мозга [135; 136].

Поверхность полимерных наночастиц может быть модифицирована различными векторами для рецептор-опосредованного транспорта, такими как трансферрин или антитела к трансферриновым рецепторам, инсулин и антитела к инсулину, ТАТ-белки, медиаторы. Расположенные на поверхности наночастиц векторы взаимодействуют со специфическими рецепторами эндотелиальных клеток ГЭБ, что делает возможным доставку векторизованных наночастиц путем рецептор-опосредованного трансцитоза в мозг, где ЛВ взаимодействует со специфическими рецепторами и оказывает фармакологический эффект [137]. Тем не менее, следует отметить, что механизм пересечения ГЭБ в случае доставки наночастиц должен быть завершен на всех этапах. Это означает, что наноноситель должен быть эффективно подвергнут эндоцитозу, затем трансцитозу и, наконец, экзоцитозу. В некоторых работах было показано, что процесс экзоцитоза не происходит, если связь между лигандом и рецепторами (например, рецептором трансферрина), которые запускают процесс пересечения ГЭБ, слишком сильна. Это будет означать, что наноноситель никогда не будет способен взаимодействовать с клетками мозга, так как он все еще связан с эндотелиальной клеткой [138; 139].

В условиях патологии, например, при воспалении, может происходить нарушение резистентности ГЭБ, то есть возрастание неспецифической проницаемости ГЭБ для лекарственных веществ и других веществ. В этот процесс могут быть вовлечены такие процессы, как расхождение «плотных контактов», увеличение активности пиноцитоза, повреждение мембран астроцитов и эндотелиальных клеток (уменьшение ригидности, формирование пор), нарушение целостности базальной мембраны [140].

## 1.6. Системы доставки доксорубицина для терапии глиобластомы на основе полимерных наночастиц

Как было отмечено ранее, системы на основе нано-носителей могут быть использованы для доставки высокомолекулярных веществ [141; 142] и малых молекул, в том числе доксорубицина [132; 3], в мозг. В подавляющем большинстве систем доставки в качестве векторов, способствующих транспортировке носителей через ГЭБ, используются различные биомолекулы [143; 144]. Например, нагруженные доксорубицином НЧ PLGA, поверхность которых модифицирована конъюгатом глутатион-ПЭГ, продемонстрировали большую проницаемость по сравнению со свободным доксорубицином на *in vitro* модели ГЭБ (Transwell™) [145]. В то же время модификация поверхности полимерных НЧ определенными ПАВ, является более простой, но не менее успешной стратегией, основанной на привлечении биомолекул крови, участвующих в эндогенном транспорте через ГЭБ [146]. Данная стратегия была успешно применена на моделях ортотопической глиобластомы на животных. Так, было показано, что ПБЦА НЧ, нагруженные доксорубицином и покрытые полисорбатом 80 или полуксамером 188, значительно увеличивают время выживания крыс с интракраниально имплантированной глиобластомой 101/8; длительная ремиссия наблюдалась у более чем 20% животных [147]. Свободный доксорубицин был значительно менее эффективен в этих экспериментах, что неудивительно, поскольку он является субстратом Р-гликопротеина и, следовательно, его захват в головном мозге и опухолях головного мозга ограничивается ГЭБ [108]. Также было показано, что за счет покрытия полисорбатом 80 или полуксамером 188 ПБЦА НЧ адсорбируют на своей поверхности апополипротеины Е, В или А<sub>1</sub> плазмы из крови [132]. Именно эти факты вместе с подтвержденным проникновением как частиц, так и ЛВ в мозг привели к гипотезе о том, что, взаимодействуя с соответствующими рецепторами, экспрессируемыми эндотелиальными клетками мозга, эти апополипротеины обеспечивают перемещение наночастиц через ГЭБ через рецептор-опосредованный эндоцитоз [148]. Эффективность этих апополипротеинов в качестве векторов для нацеливания на мозг была подтверждена с использованием наночастиц человеческого сывороточного альбумина, модифицированных апополипротеинами Е и А<sub>1</sub>, ковалентно связанными с их поверхностью [141; 149; 150]. Векторизованные наночастицы альбумина были визуализированы в головном мозге с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) [149; 150]. Кроме всего прочего, ПБЦА НЧ, нагруженные доксорубицином, продемонстрировали благоприятный токсикологический профиль [151]. Тем не менее, скорость высвобождения доксорубицина из НЧ была довольно высокой.

Несколько лет спустя очень похожий подход был использован для доставки

доксорубицина в мозг с использованием PLGA НЧ, покрытых поллоксамером 188: при этом была показана высокая эффективность в отношении интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс [2; 3]. Безопасность исследуемого лекарственного препарата, содержащего наночастицы PLGA, нагруженные доксорубицином, была недавно оценена в клиническом исследовании фазы I у пациентов с рецидивирующими солидными опухолями, включая мультиформную глиобластому. Композиция хорошо переносилась без какой-либо ограничивающей дозу токсичности даже при самой высокой дозе 90 мг/м<sup>2</sup> (доксорубицина) [4].

Несмотря на то, что путем варьирования соотношения лактид:гликолид в сополимере PLGA позволяет до некоторой степени контролировать скорость высвобождения ЛВ, вследствие умеренной растворимости амфифильной молекулы доксорубицина в воде можно ожидать его значительного высвобождения в плазме крови в течение первых часов после инъекции [152; 153]. Поэтому высокая скорость высвобождения доксорубицина из PLGA НЧ *in vivo* при циркуляции в крови может ограничивать величину эффективной дозы, которая будет доставлена в мозг в составе НЧ. В то же время, низкая скорость высвобождения доксорубицина из матрицы носителя после достижения целевого места – ткани мозга, может приводить к созданию недостаточной для эффективного ингибирования роста опухоли концентрации терапевтического агента. Таким образом, для достижения максимального противоопухолевого эффекта необходимо выявление оптимальной степени включения / нагрузки ЛВ и скорости высвобождения *in vivo*.

### **1.7. Роль оценки корреляции свойств наночастиц *in vitro* / *in vivo* в фармацевтической разработке нано-препаратов на их основе**

Выведение на рынок биосовместимых или биоактивных НЛФ для медицинского применения является дорогостоящим и трудоемким процессом. Несмотря на многочисленные исследования в области наномедицины, с момента регистрации первого наноразмерного препарата (1995 год), по состоянию на 2016 год FDA был одобрен всего 51 наноразмерный лекарственный препарат (то есть за 20 лет 51 препарат) [154], при том что всего в среднем FDA одобряет по 37 новых препаратов в год. По данным на 2017 год FDA получило более 400 заявок на разрешение проведения клинических исследований и/или регистрацию липосомальных лекарственных препаратов (исключая комбинированную терапию), и в настоящее время на рынке США имеется восемь утвержденных липосомальных лекарственных препаратов. Был проведен общий анализ распределения заявок: 84% представленных липосомальных препаратов были предназначены для внутривенного введения; 31% составляли липосомальные формы

доксорубицина гидрохлорида; формы для терапии злокачественных новообразований составляли большинство (63%). С точки зрения качества, основными проблемами при разработке липосомальных лекарственных препаратов являлись определение физико-химических и количественных параметров и поиск подходящих стратегий контроля во время разработки продукта (на май 2017 года) [155].

Что касается полимерных НЧ, на сегодняшний день нет одобренных к медицинскому применению наночастиц на основе PLGA для внутривенного введения. Более того, согласно базе данных клинических исследований Национальной медицинской библиотеки США (NLM) на сегодняшний день завершено более 240 клинических исследований ЛФ (без учета КИ на территории РФ), содержащих наночастицы, для терапии опухолей. Более 30 КИ, 26 из которых проводятся в США, находятся активной фазе (по данным базы [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)). Однако среди них нет ни одного КИ, посвященного наносомальным формам на основе PLA / PLGA. В РФ наносомальная форма доксорубицина на основе PLGA наночастиц (ООО «Технология лекарств»), успешно прошла I фазу клинических исследований (Рандомизированное клиническое исследование №329 (23.06.2015)) и в настоящее время находится на II фазе клинических исследований (Рандомизированное клиническое исследование №406 (27.07.2017)) у пациентов с глиобластомой [4].

Преимущество наночастиц по сравнению с обычной лекарственной формой, показанное в стандартных экспериментах *in vitro* и *in vivo*, не всегда реализуется ввиду вариабельности биологического ответа на сложную лекарственную форму [156]. Эффективность разработки систем доставки на основе наночастиц можно значительно повысить путем использования более рациональных подходов, сочетающих как экспериментальные, так и вычислительные методы, такие как, например, математическое (*in silico*) моделирование взаимодействий наноразмерных объектов с биологическими системами [157].

Основной целью фармацевтической разработки ЛФ является адекватная оценка эффективности и безопасности ЛФ *in vitro* и *in vivo*. Процесс фармацевтической разработки НЛФ, методов контроля качества с учетом требований к сложным ЛФ, содержащим наноматериалы [158], и комплекса исследований для оценки биофармацевтических и биологических свойств требует длительного времени и ресурсов. При разработке наночастиц для биомедицинского применения, в том числе, для лечения заболеваний, необходимо подробное изучение взаимодействия наночастиц с биологическими объектами:

- изучение взаимодействия наночастиц с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами (РНК, ДНК, клеточные мембраны, рибосомы, ферменты);
- изучение способов проникновения наночастиц через биомембраны, взаимодействия с мембранными рецепторами;

- изучение изменения свойств наночастиц в составе модельных систем, воспроизводящих различные среды живого организма (содержимое кишечника и желудка, лимфа, кровь, моча, желчь и т.д.);
- определение параметров хронической и острой токсичности, органотоксичности (нейротоксичность, гепатотоксичность, кардиотоксичность, иммунотоксичность и др.) и отдаленных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, канцерогенность), а также распределения наноматериалов по органам и тканям.

Именно недостаточное понимание взаимодействия нано- и биообъектов является основной причиной ограниченного биомедицинского применения наночастиц. Все эти свойства должны быть изучены для создания и выведения на рынок лекарственных форм на основе наночастиц, поскольку безопасность, является одним из главных критериев качества лекарственных средств, наряду с эффективностью. В США для этих целей существует специальная организация – Лаборатория характеристики нанотехнологий (*англ.* Nanotechnology Characterization Laboratory, US-NCL), которая была учреждена Национальным институтом рака (*англ.* National Cancer Institute, NCI) совместно с Национальным институтом стандартов и технологий (*англ.* National Institute of Standards and Technology, NIST) и Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (*англ.* Food and Drug Administration, FDA) для проведения доклинических испытаний наночастиц на эффективность и токсичность. Такого же рода лаборатория осуществляет свою деятельность в Европе (EU-NCL).

Одним из ключевых параметров наноразмерной системы доставки ЛВ является профиль высвобождения ЛВ из носителя. Корреляция *in vitro* и *in vivo* (IVIVC) - это прогностическая математическая модель, описывающая взаимосвязь между поведением лекарственных препаратов *in vitro* и *in vivo* [159]. В настоящее время, потребность в инструменте для надежной корреляции данных высвобождения лекарственного средства *in vitro* и *in vivo* (IVIVC) чрезвычайно возросла. Рост числа исследований в области разработки IVIVC указывает на все увеличивающуюся потребность в IVIVC для фармацевтической промышленности. Так за последние 5 лет по данным базы Pubmed опубликовано 246 статей, посвященных разработке моделей IVIVC. Применение математического моделирования в комплексе с традиционными физико-химическими, биологическими и фармакологическими методами *in vitro* и *in vivo* позволит сократить затраты на разработку и время выведения сложных ЛФ на основе систем доставки на рынок без ущерба для безопасности и эффективности.

Концепция *in vitro/in vivo* корреляций (IVIVC), разработанная изначально для пероральных ЛФ, в том числе форм пролонгированного действия, в настоящее время применяется и для парентеральных депо-форм на основе микросфер PLGA [160-162]. В

литературе описаны также прогностические модели IVIVC для НЛФ, например, наносuspензии карбамазепина на основе Eudragit® L100 [163] и наночастиц Eudragit RL 100, нагруженных атазанавиром [164], однако эти формы предназначены для перорального пути введения. Эффективные прогностические модели IVIVC для парентеральных форм на основе наночастиц, в том числе и наночастиц PLGA, до настоящего времени не разработаны.

Известно, что основным фактором, определяющим успешность разработки эффективной модели IVIVC для НЛФ, является применение методов, позволяющих *in vitro* точно имитировать высвобождение/растворение ЛФ в физиологических условиях. В настоящее время происходит разработка новых подходов к изучению и математическому моделированию кинетики высвобождения ЛВ из носителя *in vitro* и их применение для разных типов систем доставки [165; 166]. При попадании в кровь наночастицы взаимодействуют с ее компонентами [167]. Так наночастицы адсорбируют белки плазмы, связываются с мембранами клеток крови (в том числе, эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов) и могут интернализироваться внутрь этих клеток. Известно также, что параметры этого взаимодействия зависят от физико-химических параметров наночастиц – размера, заряда, гидрофобности и пр. [168]. В связи с этим, при интерпретации фармакокинетических *in vivo* исследований НЛФ необходимо учитывать факторы, оказывающие влияние на биораспределение, такие как опсонизация, связывание с эритроцитами крови и захват фагоцитирующими клетками крови (моноциты, нейтрофилы).

Таким образом, именно комплексный анализ ключевых параметров НЧ, которые могут повлиять на безопасность и эффективность наноразмерной лекарственной формы, в процессе фармацевтической разработки и доклинических исследований, является залогом и главным критерием успешного прохождения клинических испытаний. Выявление параметров, которые определяют профиль токсичности и эффективность доставки лекарственной формы в целевые ткани и органы, позволит интерпретировать результаты клинических исследований.

Целью настоящего исследования явилось получение, биофармацевтический анализ и изучение фармакокинетики наносомальных форм доксорубина на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) с различным профилем высвобождения доксорубина. Для решения поставленной цели необходимо выявление факторов, обеспечивающих возможность получения наночастиц на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот с заранее заданным профилем высвобождения из них доксорубина (PLGA-Dox) *in vitro* и оценка влияния физико-химических параметров PLGA-Dox НЧ и профиля высвобождения *in vitro* на фармакокинетику *in vivo*. Анализ литературных данных показал актуальность поставленной цели и перспективность выбранного направления.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Реактивы и расходные материалы

Для получения наночастиц были использованы: доксорубицина гидрохлорид (99,0%, Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals, Китай; 99,5%, Teva, Sicor, Италия; 99,0%, Sigma-Aldrich, Германия); сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) с соотношением звеньев лактид-гликолид 50:50 с концевыми кислотными группами, в том числе Resomer® 502H с характеристической вязкостью 0,2 дл/г, Mw 10-12 кДа (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия), Lactel® с характеристической вязкостью 0,18 дл/г и 0,66 дл/г (Lactel Absorbable Polymers, США), олигомер Resomer® Condensate с концевыми карбоксильными группами с молекулярным весом 800 Да (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия), а также Resomer® 502S с концевыми эфирными группами с характеристической вязкостью 0,2 дл/г (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия); диоктилсульфосукцинат натрия (АОТ, Sigma-Aldrich, США); поливиниловый спирт (ПВС, 9–10 кДа, степень гидролиза 80%, Sigma, Германия); полоксамер 188 (Kolliphor® P 188, BASF, Германия); альбумин человеческий 20%, раствор для инфузий 200 мг/мл (Baxter AG, Австрия); Sephadex® G-25, GE Healthcare, Швеция. Для лиофилизации наночастиц были использованы следующие криопротекторы: D-маннит, D(+)-трегалоза дигидрат, сахароза, D(+)-лактоза моногидрат (Диаэм, Россия). Фосфатный буфер для получения наночастиц готовили с использованием таблеток PBS (MP Biomedicals, LLC, США).

Для приготовления буферов для проведения исследований кинетики высвобождения *in vitro* использовали HEPES (1 М, pH 7,0-7,6, Sigma-Aldrich, США), MES (Sigma-Aldrich, США), Tween® 80 (Sigma-Aldrich, США), натрия ацетат безводный (Химмед, Россия), фосфатный буфер, приготовленный с использованием динатрия гидрофосфата и калия дигидрофосфата (Panreac, Испания).

Для ВЭЖХ анализа использовали ацетонитрил (АЦН) 99,9%, ортофосфорную кислоту 85% и додецилсульфат натрия (PanReac Applichem, Германия), стандарты даунорубицина гидрохлорида (EP CRS, 98,5 %, EDQM), доксорубицина гидрохлорида (EP CRS, 99,0 %, EDQM) и эпирубицина гидрохлорида (EP CRS, 99,5 %, EDQM). Все другие реагенты, включая дихлорметан (ДХМ) и диметилсульфоксид (ДМСО), соответствовали квалификации ч.д.а.

### 2.2. Оборудование

Исследования были выполнены на базе лаборатории систем направленного транспорта

(ЛСНТ) Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России и Инжинирингового центра РХТУ им. Д.И. Менделеева. В работе использовали следующее оборудование: анализаторы размеров и зарядов наночастиц, в том числе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания), NanoBrook Omni (Brookhaven, США); диспергатор Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия); гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США); лиофильная сушка Alpha 2-4 LSCplus (Martin Christ GmbH, Германия); электронные аналитические весы GH-200 (A & D, Япония); pH-метр Seven Compact S220 (Mettler Toledo, США); шейкер Test Tube Shaker Vortex (VWR International, Бельгия); система очистки воды Milli-Q (Merck Millipore, Германия); роторный испаритель Laborota 4000 (Heidolph Instruments GmbH and Co. KG, Германия); центрифуга 5804R (Eppendorf, Германия); центрифуга Avanti JXN-30 Centrifuge System (Beckman Coulter, США); система капиллярного электрофореза Капель 105М, Люмэкс, Россия с программным обеспечением Эльфоран® (Люмэкс, Россия); спектрофотометр UV-1800 (Shimadzu, Япония); настольный шейкер-инкубатор ES-20 (ООО «Biosan», Латвия); шейкер ThermoMixer C (Eppendorf AG, Германия); центрифуга Hettich Universal 320R лабораторная с бакет-ротором № 1628 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия); ультразвуковая ванна FB15049 (Fisher Brand, Германия); магнитная мешалка RO 10 (IKA Werke GmbH, Германия); система ВЭЖХ LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенная диодно-матричным детектором; титратор Фишера с генерирующим электродом без диафрагмы 831 KF Coulometer (Metrohm, Швейцария), оснащенный печью 860 KF Thermoprep (Metrohm, Швейцария).

Анализ размера наночастиц методом электронной микроскопии проводили с использованием просвечивающего электронного микроскопа JEM-1400 (JEOL, Япония), исследование проводили на базе учебно-научного центра «Международная школа микроскопии» Национального исследовательского технологического университета «МИСиС».

Исследование молекулярно-массового распределения полимеров проводили с использованием хроматографа высокого давления, оснащенного системой колонок Styragel HR 5E, HR 4E (300 × 7,8 мм) и рефрактометрическим детектором Waters 2414 (Waters Corporation, США) в Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН).

Для оценки гемолитической активности наночастиц использовали планшетный анализатор EnSpire (PerkinElmer, США); исследование проводили на кафедре медицинских нанобиотехнологий ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Количественный анализ доксорубина в плазме крыс при изучении фармакокинетики наносомальных форм доксорубина проводили с использованием ВЭЖХ системы Agilent 1200, оснащенной диодно-матричным и флуоресцентным детекторами и колонкой ZORBAX

Eclipse XDB-C18 (80Å, 5 мкм, 150 x 3 мм, Agilent Technologies, США). Исследование проводили на базе лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России.

Исследование содержания влаги в образцах наночастиц проводили методом термогравиметрии с использованием термоанализатора TGA/DSC 3+ Mettler Toledo; температуру стеклования полимеров определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии с использованием калориметра Mettler TA-4000 (Mettler Toledo GmbH, Германия) с измерительной ячейкой DSC-30. Исследования проводили в лаборатории № 21 "Модификации полимеров" им. Н.А. Платэ (Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук).

### **2.3. Получение наносомальной формы доксорубина (PLGA-Dox)**

#### **2.3.1. Получение наночастиц PLGA-Dox**

Наночастицы на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), нагруженные доксорубином (PLGA-Dox), были получены методом гомогенизации под высоким давлением с последующим выпариванием растворителя (метод «двойных эмульсий»,  $W_1/O/W_2$ ). Раствор 120 мг доксорубина гидрохлорида в 4,8 мл 0,001 н соляной кислоты (водная фаза –  $W_1$ ) смешивали с раствором 1,2 г PLGA в 7,2 мл дихлорметана (органическая фаза – O). Весовое соотношение доксорубин – PLGA составляло 1:10. Смесь эмульгировали, используя роторный смеситель с высоким усилием сдвига Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия) в течение 1 мин при 23600 об/мин. Полученную первичную эмульсию затем добавляли к 60 мл 1 % водного раствора поливинилового спирта (9-10 кДа) в фосфатном буфере (PBS) (внешняя водная фаза –  $W_2$ ), и смесь снова гомогенизировали с помощью Ultra-Turrax T-18 в течение 2 мин, а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США) при 1034 бар (15 000 psi) в течение 3 мин при охлаждении; температуру эмульсии поддерживали в интервале 20-21 °С. Далее остаточный органический растворитель удаляли под вакуумом (до 20 мбар) с использованием роторного испарителя. Полученную наносуспензию фильтровали через стеклянный фильтр (Por1, размер пор 90-150 мкм); затем добавляли криопротектор, разливали во флаконы (по 1,5 мл) и лиофилизировали (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ GmbH, Германия). Лيوфилизированные образцы хранили при 4 °С. При оптимизации параметров лиофилизации наночастиц варьировали тип (маннит, трегалоза, сахароза и лактоза) и концентрацию (2,5, 5 и 10%)

криопротектора. Параметры лиофильной сушки: основная сушка в течение 24 ч, давление 0,340 мбар; окончательная сушка в течение 1 ч, давление 0,035 мбар.

Для получения наночастиц с разной степенью включения и скоростью высвобождения доксорубина варьировали следующие параметры: кислотность внешней водной фазы двойной эмульсии (1 % ПВС в PBS) при получении НЧ (рН 6,4 или 7,4); состав полимерной композиции, в том числе наличие/отсутствие концевых карбоксильных групп в молекулах PLGA (Resomer® 502H, Resomer® 502S или их смесь), молекулярный вес PLGA (10-12 кДа или 4-5 кДа, вязкость 0,2 и 0,18 дл/г, соответственно).

Для получения наночастиц с медленным высвобождением доксорубина использовали PLGA с высокой вязкостью (Lactel®, 0,66 дл/г), при этом для повышения степени включения доксорубина в полимерную композицию вводили олигомер PLGA Resomer® Condensate с молекулярной массой 800 Да с карбоксильными концевыми группами в весовом соотношении 20:1.

Кроме того, для получения НЧ с медленным высвобождением доксорубина в НЧ включали гидрофобный комплекс доксорубина с диоктилсульфосукцинатом натрия (АОТ) в мольном соотношении 1:1; наночастицы получали методом «одинарных эмульсий». Для этого раствор 120 мг доксорубина гидрохлорида в 4,8 мл 0,001 н. соляной кислоты смешивали с раствором 91,98 мг АОТ в 7,2 мл дихлорметана в делительной воронке. Экстракцию комплекса АОТ-доксорубин в дихлорметан проводили в течение 24 ч с последующим отделением органической фазы, объем которой затем доводили до 12 мл. В органической фазе затем растворяли 1,2 г PLGA Resomer® 502H; смесь далее добавляли к 60 мл 1 % водного раствора поливинилового спирта (9-10 кДа), гомогенизировали сначала с помощью Ultra-Turrax T-18 Basic в течение 2 минут, а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США) при 1034 бар в течение 3 мин. Остаточный органический растворитель удаляли под вакуумом, наносуспензию фильтровали, добавляли криопротектор, разливали во флаконы и лиофилизировали как описано выше.

Для получения отмытых от несвязанной фракции доксорубина НЧ, свободный доксорубин отделяли методом гель-фильтрации на колонке, заполненной гелем Sephadex® G25 (GE Healthcare, Швеция). Для этого 10 мл сконцентрированной в 2 раза суспензии НЧ наносили на колонку (32 × 110 мм, объем геля ≈ 70 мл), собирали фракцию «отмытых» от свободного доксорубина НЧ (12-15 мл) и лиофильно высушивали.

Для модификации поверхности НЧ полоксамером 188 (P188) лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1 % растворе P188 и инкубировали в течение 30 минут перед проведением дальнейших исследований.

### 2.3.2. Получение наночастиц плацебо-PLGA

НЧ-плацебо получали по аналогичной методике (п. 2.3.1). Органическую фазу (О), представляющую собой раствор 1,2 г PLGA в 7,2 мл дихлорметана, эмульгировали с 4,8 мл 0,001 н соляной кислоты при помощи Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия) в течение 1 мин при 23600 об/мин. Полученную первичную эмульсию затем добавляли к 60 мл 1 % водного раствора поливинилового спирта (9-10 кДа) в фосфатном буфере (PBS), и смесь снова гомогенизировали сначала с помощью Ultra-Turrax T-18 Basic в течение 2 минут, а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США) при 1034 бар в течение 3 мин; остаточный органический растворитель удаляли под вакуумом. Далее наносuspension фильтровали, добавляли криопротектор, разливали во флаконы и лиофилизировали (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ GmbH, Германия). Лيوфилизированные образцы хранили при 4 °С.

## **2.4. Оптимизация методов оценки и стандартизации физико-химических параметров наночастиц PLGA, нагруженных доксорубицином**

Разработка и оптимизация методов определения физико-химических параметров и контроля качества полученных наносомальных форм доксорубицина на основе PLGA была проведена в соответствии с международными требованиями для лекарственных средств, содержащих наноматериалы (FDA, EMA) и каскадными протоколами анализа нанотехнологичных ЛС, одобренными в EMA и FDA [169].

Оптимизацию методов определения физико-химических параметров наночастиц PLGA, нагруженных доксорубицином, и плацебо-PLGA осуществляли в лаборатории систем направленного транспорта (ЛСНТ) Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России; лабораториях Инжинирингового центра РХТУ им. Д.И. Менделеева; лабораториях учебно-научного центра «Международная школа микроскопии» Национального исследовательского технологического университета «МИСиС»; лаборатории № 21 "Модификации полимеров" им. Н.А. Платэ (Института нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук).

### 2.4.1. Определение размеров PLGA наночастиц и распределения по размерам

Средний гидродинамический диаметр частиц и распределение частиц по размерам (PDI)

определяли методом динамического рассеяния света (*англ.* dynamic light scattering, далее – DLS) с помощью различных анализаторов: Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) или NanoBrook Omni (Brookhaven, США). Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в высокоочищенной воде Milli-Q, а затем разбавляли до концентрации 0,2 мг/мл по полимеру, далее проводили измерение размеров при +25 °С, предварительно дегазируя образцы в течение 30 секунд; параметры измерения приведены в таблице 2. Все измерения проводили четыре раза, результат усредняли.

Таблица 2 – Условия измерения размеров наночастиц и распределения по размерам

Условия измерения	Тип анализатора		
	Zetasizer Nano ZS	NanoBrook Omni	
Источник лазера	Гелий-неоновый лазер, мощность 4 мВт	Твердотельный лазер, мощность 35 мВт	
Длина волны лазера	633 нм	640 нм	
Угол рассеяния света	173°	173°	
Температура образца	25°С	25°С	
Нижний предел измерения размера	1 нм	1 нм	
Время термостатирования	120 секунд	120 секунд	
Время измерения	60-70 секунд	60 секунд	
Параметры образца		Параметры дисперсионной среды	
Материал	polystyrene latex (полистирольные частицы)	Тип дисперсионной среды	вода
Коэффициент преломления образца	1,590	Динамическая вязкость дисперсионной среды, $\mu$ , Па $\times$ с	0,8872
Абсорбция образца	0,010	Показатель преломления дисперсионной среды	1,330

Для оценки влияния параметров измерения на качество и величину измеряемых значений, а также изучения стабильности полученных наночастиц в различных средах, измерение размеров и PDI НЧ проводили также в других дисперсионных средах. Для этого лиофилизированные НЧ ресуспендировали в высокоочищенной воде Milli-Q, а затем разбавляли до необходимой концентрации соответствующей дисперсионной средой. При этом

варьировали следующие параметры: концентрация наночастиц в измеряемом образце (0,1-0,4 мг/мл по полимеру); тип дисперсионной среды (вода Milli-Q; 1 % раствор полоксамера 188; раствор натрия хлорида 0,9%; 10 мМ раствор натрия хлорида; 1X фосфатный буфер (PBS) из таблетки; 10 мМ PBS; 4% раствор человеческого сывороточного альбумина (ЧСА)). Вязкость образца считали равной вязкости дисперсионной среды; при измерении указывали соответствующие значения показателей преломления и динамической вязкости соответствующей дисперсионной среды при заданной температуре, если они существенно отличались от показателей для воды (таблица 3).

Таблица 3 – Параметры дисперсионных сред для измерения размеров наночастиц и PDI

Дисперсионная среда	Показатель преломления дисперсионной среды	Динамическая вязкость дисперсионной среды, $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$
Вода Milli-Q	1,330	0,8872
Раствор натрия хлорида 0,9% (0,16 М)	"	"
10 мМ раствор натрия хлорида	"	"
1X PBS (0,15 М)	"	"
10 мМ PBS	"	"
1 % раствор полоксамера 188	1,334	0,9800
4% раствор ЧСА	1,341	1,3462

При исследовании стабильности наночастиц в дисперсионной среде разведенную суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 1, 2, 4, 6 и 24 ч, далее проводили измерения после обработки ультразвуком в УЗ-бане в течение 30 секунд. Все измерения проводили четыре раза, результат усредняли.

#### 2.4.2. Определение заряда поверхности PLGA наночастиц

Потенциал поверхности ( $\zeta$ -потенциал, мВ) наночастиц (далее – заряд) определяли методом электрофоретического рассеяния света с использованием Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Malvern, Великобритания). Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в воде Milli-Q, проводили измерение неразбавленных и разбавленных до концентрации 0,2 мг/мл по полимеру образцов НЧ, измерение проводили 4 раза, результаты усредняли.

Определение  $\zeta$ -потенциала основано на измерении электрофоретической подвижности частиц с использованием эффекта Доплера. При помещении дисперсии частиц в электрическое поле происходит их перемещение со скоростью, которая зависит от  $\zeta$ -потенциала.

Запатентованная технология M3-PALS (рассеяние света с фазовым анализом) позволяет рассчитать электрофоретическую подвижность, и далее –  $\zeta$ -потенциала и его распределение.

#### 2.4.3. Определение размера и морфологии поверхности PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, с помощью просвечивающей электронной микроскопии

Размер и морфологию НЧ оценивали при помощи просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ, микроскоп JEM-1400, JEOL, Япония); ускоряющее напряжение 120 кВ, диапазон увеличений при съёмке от 30000 до 150000 раз. Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в высокоочищенной воде Milli-Q, каплю образца наносили на сетку для поддержки образцов, после высыхания дополнительно контрастировали 1 % раствором уранила ацетата. Исследование проводили на базе учебно-научного центра «Международная школа микроскопии» Национального исследовательского технологического университета «МИСиС».

#### 2.4.4. Определение содержания полимера в PLGA наночастицах

Содержание полимера в PLGA НЧ определяли методом капиллярного зонального электрофореза (КЭФ); для анализа использовали методику, описанную в [170] и адаптированную для настоящего эксперимента. Для анализа использовали систему капиллярного электрофореза Капель 105М (Люмэкс, Россия), оснащенную спектрофотометрическим детектором и кварцевой капиллярной трубкой (внутренний диаметр 75 мкм, эффективная длина 50 см, общая длина 60 см), в сочетании с программным обеспечением Эльфоран® (Люмекс, Россия). Во флакон с лиофилизатом НЧ добавляли 2 мл 1,0 н раствора NaOH; смесь инкубировали 24 ч при +37 °С при перемешивании (200 об/мин). Гидролизат разбавляли в 1000 раз водой Milli-Q и определяли содержание полимера по количеству молочной кислоты, образующейся в результате гидролиза.

Концентрацию молочной кислоты измеряли при длине волны 254 нм; гидродинамический ввод пробы: 30 мбар в течение 10; время обнаружения – 4 мин; напряжение при разделении составляло -20 мВ; температура +25 °С. Раствор электролита содержал 10 мМ бензойной кислоты, 0,5 мМ гидроксида цетилтриметиламмония, и рН доводили до 8,6 с использованием 9 мМ раствора диэтаноламина. Количество полимера определяли по пику молочной кислоты на электрофореграмме с использованием калибровочной кривой.

#### 2.4.5. Определение числа карбоксильных групп на поверхности PLGA наночастиц

Число карбоксильных групп на поверхности НЧ определяли обратным потенциометрическим титрованием в водной среде с использованием рН-метра SevenCompact S220 со стеклянным электродом (Mettler Toledo, США). В качестве титранта использовали 0,01 н. раствор соляной кислоты. Предварительно образцы НЧ отмывали от водорастворимой фракции полимера центрифугированием в течение 30 мин ( $20000 \times g$ ,  $+5^\circ \text{C}$ ) с использованием центрифуги 5804R (Eppendorf, Германия), восстанавливали осадок водой Milli-Q и ресуспендировали с использованием УЗ-бани. Полученные дисперсии титровали. Во флакон, содержащий промытые НЧ, добавляли 7 мл дистиллированной воды и 1 мл 0,01 н. раствора NaOH, затем смесь тщательно перемешивали и подвергали потенциометрическому титрованию 0,01 н. раствором HCl. Аналогично проводили контрольное титрование 1 мл 0,01 н. раствора NaOH. Измерения были повторены дважды.

#### 2.4.6. Определение общего содержания доксорубина в PLGA наночастицах и степени включения методом спектрофотометрии

Общее содержание доксорубина в PLGA-Dox НЧ определяли спектрофотометрически (Shimadzu UV-1800, Япония). Для этого лиофилизат НЧ (1 флакон) растворяли в 2 мл ДМСО, добавляли 40 мкл 0,1 н. соляной кислоты, далее аликвоту (100 мкл) переносили в колбу на 5 мл, добавляли 50 мкл 0,1 н. соляной кислоты и доводили объем до метки ДМСО. Концентрацию доксорубина в полученном растворе определяли спектрофотометрически при длине волны 480 нм по предварительно построенной калибровочной кривой ( $A=0,0214 \times C$ ; 0,00-52 мкг/мл;  $R^2=0,9995$ ). Для определения каждого показателя проводили 3 параллельных измерения ( $n=3$ ).

Степень включения доксорубина в PLGA-Dox НЧ оценивали путем отделения фракции НЧ от свободного доксорубина методами центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации.

##### 2.4.6.1. Метод центрифугирования

Лиофилизат НЧ ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды, НЧ отделяли центрифугированием с использованием различных режимов: 1) на центрифуге 5804R (Eppendorf, Германия), ускорение  $15000 \times g$ , 30 мин при  $+18^\circ \text{C}$ ; 2) на ультрацентрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США), ускорение  $20000 \times g$  /  $30000 \times g$  /  $48254 \times g$  /  $75000 \times g$  /  $100000 \times g$ , 30 мин при  $+5^\circ \text{C}$ . Объем центрифугируемой суспензии и отбираемой аликвоты

супернатанта для анализа составляли в первом случае 0,5 и 0,05 мл, во втором – 1 и 0,2 мл соответственно. Концентрацию свободного доксорубина в супернатанте определяли спектрофотометрически с использованием калибровочной кривой в воде ( $A=0,0181 \times C$ , 0,00–52,50 мкг/мл;  $R^2=0,9979$ ).

Степень включения доксорубина рассчитывали как отношение (%) разницы содержания общего и свободного доксорубина к его общему содержанию в образце по формуле (1):

$$\text{Степень включения (\%)} = \frac{C_{\text{общ.}} - C_{\text{своб.}}}{C_{\text{общ.}}} \times 100\% \quad (1)$$

где  $C_{\text{общ.}}$  – концентрация общего доксорубина в восстановленной суспензии наночастиц, определенная как указано ранее;  $C_{\text{своб.}}$  – концентрация доксорубина в супернатанте после отделения НЧ.

Нагрузку (%) доксорубина в PLGA НЧ, рассчитывали по уравнению (2):

$$\text{Нагрузка (\%)} = \frac{G_{\text{Доксорубин}}}{G_{\text{PLGA}}} \times \text{Степень включения (\%)} \quad (2)$$

где  $G_{\text{доксорубина}}$  – общее содержание доксорубина [мг];  $G_{\text{PLGA}}$  – содержание PLGA [мг].

Для оценки эффективности осаждения НЧ содержание PLGA в супернатантах определяли методом КЭФ после щелочного гидролиза, как описано выше (2.4.4). Для этого к 100 мкл неразбавленного супернатанта прибавляли 10 мкл 1,0 н раствора NaOH, инкубировали 24 ч при +37 °С. Перед анализом смесь разбавляли в 100 раз водой Milli-Q. Остаточное содержание НЧ в супернатанте после центрифугирования рассчитывали, как отношение (%) содержания PLGA в супернатанте к его общему содержанию в образце. Все измерения выполняли параллельно с использованием 6 флаконов образца каждой серии PLGA-Dox НЧ.

#### 2.4.6.2. Метод ультрафильтрации

Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1,5 мл дистиллированной воды; далее 500 мкл суспензии помещали в предварительно промытые водой фильтры Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) из восстановленной целлюлозы с размером пор 10, 30, 50 и 100 кДа (NMWL) и центрифугировали (Eppendorf 5804R, 15000 × g, 30 мин, +25 °С). Концентрацию доксорубина в фильтрате и степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox НЧ рассчитывали как описано выше (n=6). Контрольный раствор доксорубина гидрохлорида с концентрацией 1,0

мг/мл подвергали ультрафильтрации в тех же условиях (n=6) для оценки степени сорбции на фильтрах (%).

#### 2.4.6.3. Метод гель-фильтрации

Для оценки степени включения свободный доксорубин отделяли методом гель-фильтрации (Sephadex® G25, GE Healthcare, Швеция; колонка 32 × 110 мм, объем геля ≈ 70 мл). Для оценки влияния объема анализируемого образца на качество разделения на колонку наносили образцы сконцентрированной в 2 раза суспензии НЧ объемом 2–3 мл или 10–12 мл; фракцию «отмытых» от свободного доксорубина НЧ (10–15 мл) собирали и лиофильно высушивали. Отношение массы доксорубина к массе PLGA (Dox:PLGA) в отмытых НЧ и в образцах до отделения свободной фракции доксорубина («неотмытые» НЧ) и степень включения (%) доксорубина в НЧ рассчитывали по уравнениям (3) и (4):

$$Dox:PLGA = \frac{G_{\text{доксорубин}}}{G_{PLGA}} \quad (3)$$

$$\text{Степень включения (\%)} = \frac{Dox:PLGA_{\text{отмытые}}}{Dox:PLGA_{\text{неотмытые}}} \times 100\% \quad (4)$$

где  $G_{\text{доксорубин}}$  – общее содержание доксорубина во флаконе [мг];  $G_{PLGA}$  – содержание PLGA во флаконе [мг].

Отделение свободной фракции доксорубина от НЧ методом гель-фильтрации в обоих случаях проводили в двукратной повторности для оценки сходимости; содержание доксорубина и PLGA в «отмытых» НЧ определяли для трех параллельных образцов.

#### 2.4.7. Определение общего содержания доксорубина в PLGA наночастицах и степени включения методом ВЭЖХ

Во флакон с лиофилизатом наночастиц добавляли 2 мл ДМСО. Аккуратно, количественно переносили полученный раствор в мерную колбу вместимостью 20 мл, смывая остатки из флакона растворителем для проб (0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде, pH ≈ 2), далее доводили тем же растворителем до метки, перемешивали. Полученный раствор, имеющий легкую опалесценцию, центрифугировали в течение 15 минут (5804R, Eppendorf, 15000 × g, +18 °C), содержание доксорубина (общее) в НЧ определяли в супернатанте.

Для определения свободного доксорубина (не связанного с НЧ) лиофилизат восстанавливали в исходном объеме воды Milli-Q (1,5 мл), 1 мл суспензии центрифугировали в

течение 30 мин Avanti JXN-30, Beckman Coulter,  $48254 \times g$ ,  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). К 200 мкл супернатанта добавляли 800 мкл растворителя для проб, перемешивали и анализировали содержание доксорубицина.

Содержание общего и свободного доксорубицина в НЧ определяли методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием с использованием системы ВЭЖХ LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенной диодно-матричным детектором, колонка Symmetry 300 C18 (150 x 3,9 мм, 5 мкм зернение), объем ввода пробы – 10 мкл. Разделение проводили в изократическом режиме элюирования смесью подвижных фаз (ПФ) А и Б (70:30), скорость потока ПФ – 1,0 мл/мин, температура анализа  $+35 \text{ }^\circ\text{C}$ , температура пробы  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ . ПФ А представляла собой 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в воде; ПФ Б – 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (АЦН).

Калибровочная кривая  $S = f(C)$  для расчета содержания доксорубицина в анализируемых образцах была построена с использованием стандарта доксорубицина гидрохлорида (EP CRS, 99,0 %, EDQM) в диапазоне концентраций от 1 до 516 мкг/мл, при этом  $C$  – концентрация [мкг/мл],  $S$  – площадь пика  $D$ . Для определения чувствительности строили функцию  $\text{SNR} = f(C)$  – отношение «сигнал / шум», коэффициент  $K$  прямой использовали для расчёта пределов обнаружения и количественного определения (ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»):

$$\text{SNR} = \frac{2 \times H}{h} \quad (5)$$

$$\text{LOD} = \frac{3}{K} \quad (6)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10}{K} \quad (7)$$

где  $H$  – это высота пика на хроматограмме, измеряемая от максимума пика до экстраполированной базовой линии;  $h$  – размах фонового шума; LOD – предел обнаружения; LOQ – предел количественного определения.

Для оценки прецизионности (как повторяемости выходного сигнала) последовательно хроматографировали не менее 5 раз один и тот же стандартный раствор, для каждой инъекции применяя новую виалу. Метрологические характеристики методики количественного определения доксорубицина приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Метрологические характеристики методики количественного определения доксорубицина методом ВЭЖХ

Показатель	Значение
Калибровочная кривая	$S = 23623 \times C$ , $C$ [мкг/мл]
$R^2$ калибровочной кривой	$> 0,999$
Диапазон линейности	До 500 мкг/мл доксорубицина
Коэффициент функции $SNR = f(C)$ ,	184,43
Значение LOD	0,016 мкг/мл доксорубицина
Значение LOQ	0,054 мкг/мл доксорубицина
<b>Прецизионность (103,20 мкг/мл доксорубицина):</b>	
<b>RSD времени удерживания не более 1,0%</b>	Менее 0,1 %
<b>RSD площади не более 2,0%</b>	Менее 0,1 %

Для расчета количественного содержания общего и свободного доксорубицина во флаконе, а также степени включения (%) доксорубицина, использовали следующие уравнения:

$$G_{\text{общ.}} = \frac{S}{23623} \times \frac{20}{1000} \quad (8)$$

$$G_{\text{своб.}} = \frac{S}{23623} \times \frac{1,5}{0,2} \times \frac{20}{1000} \quad (9)$$

$$\text{Степень включения (\%)} = \frac{G_{\text{общ.}} - G_{\text{своб.}}}{G_{\text{общ.}}} \times 100\% \quad (10)$$

где  $G_{\text{общ.}}$  и  $G_{\text{своб.}}$  – содержание общего и свободного (не связанного с НЧ) доксорубицина во флаконе [мг]. Каждое измерение проводили 3 раза, результат усредняли.

#### 2.4.8. Определение примесей доксорубицина в образцах PLGA-Дох НЧ методом ВЭЖХ

Для анализа содержания примесей доксорубицина в полученных образцах наночастиц была использована методика хроматографического определения доксорубицина и его примесей, адаптированная на основании методики ультраэффективной ВЭЖХ из USP. Анализ проводили с использованием системы ВЭЖХ LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенной диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке Purospher® STAR RP-18 endcapped Hibar® RT 125-4 (125 x 4,0 мм, 3 мкм зернение; Германия), в градиентном режиме элюирования (таблица 5) смесью подвижных фаз А и Б (65 минут). В качестве ПФ А использовали 0,1 % раствор трифторуксусной кислоты (ТФК) в воде; ПФ Б представляла собой 0,1 % раствор ТФК в ацетонитриле (АЦН). Скорость потока ПФ составляла 1,0 мл/мин, температура колонки +35 °С, температура пробы +5 °С. Объем ввода пробы – 10 мкл. Детектирование проводили при

длине волны 254нм.

Таблица 5 – Программа градиентного режима элюирования

Время, мин	Подвижная фаза	
	А, %	Б, %
0	90	10
45	40	60
50	40	60
51	90	10
65	90	10

Растворы доксорубицина, эпирубицина и даунорубицина готовили непосредственно из их стандартов (CRS), используя растворитель для проб (0,1 % раствор ТФК в воде). Для получения агликона в 1 мл раствора доксорубицина (100-200 мкг/мл) добавляли 0,5 мл 99% ТФА (6,47 ммоль), выдерживали 30 мин, добавляли 6 мл 1 М КОН (6,00 ммоль). Полученный раствор анализировали. В качестве альтернативной методики, в 1 мл аналогичного раствора доксорубицина добавляли 1 мл 1 М КОН (1,00 ммоль), при этом наблюдалась синяя окраска полученного раствора. Через 30 мин инкубации добавляли 0,1 мл 99% ТФК (1,29 ммоль) и наблюдали возвращение рыжей окраски. Полученный раствор анализировали. Продукты разложения доксорубицина в щелочной среде многочисленны, среди них – эпирубицин и даунорубицин. Эпирубицин и даунорубицин в указанных условиях гидролизу до агликонов не подвергались. В таблице 6 приведены относительные времена удерживания пиков доксорубицина и его примесей.

Таблица 6 – Относительный времена удерживания пиков примесей

Наименование	Время удерживания, мин	Относительное удерживание, мин
Доксорубицин	20,6	1,00
Эпирубицин	21,5	1,04
Даунорубицин	24,6	1,19
Доксорубицинон (агликон)	22,4	1,09

Для определения содержания примесей доксорубицина в образцах PLGA-Dox НЧ во флакон с лиофилизатом добавляли 0,5 мл ДМСО, после полного растворения содержимого добавляли 4,5 мл 0,1 % водного раствора ТФК. Далее полученный раствор с лёгкой опалесценцией, который центрифугировали ( $15000 \times g$ , 15 мин, +18 °С), аликвоту супернатанта

анализировали ВЭЖХ. Содержание примесей, для которых соотношение «сигнал / шум» составлял не менее 10% рассчитывали как процент площади от общей суммы площадей (метод внутренней нормализации).

#### 2.4.9. Определение содержания остаточного ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ

Для определения содержания остаточного ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ была использована методика [171] с модификациями. Метод количественного определения ПВС основан на образовании комплекса синего цвета ПВС с йодом в йодиде калия (ПВС-I<sub>2</sub>-KI) в присутствии борной кислоты, при этом длина волны поглощения комплекса зависит от свойств полимера. Лиофилизат НЧ ресуспендировали в 3,0 мл воды очищенной, к аликвоте полученной суспензии НЧ объемом 50 мкл добавляли 50 мкл воды очищенной, затем добавляли 2 мл 0,5 н. NaOH и инкубировали при +60 °С в течение 15 мин при перемешивании на магнитной мешалке до исчезновения фиолетового окрашивания продуктов гидролиза доксорубина. После остывания растворов, добавляли 0,9 мл 1 н. HCl, 3,5 мл воды очищенной, 3,0 мл 0,65 М борной кислоты и 0,5 мл раствора 0,05 М J<sub>2</sub> в 0,15 М KJ. Через 15 мин спектрофотометрически определяли концентрацию ПВС при длине волны 679 нм и рассчитывали его содержание в исходном образце по предварительно построенной калибровочной кривой ( $A=0,0178 \times C$ ;  $R^2=0,9996$ ) в диапазоне концентраций 1 – 20 мкг/мл. Измерения проводили относительно холостого опыта (вместо суспензии НЧ использовали воду очищенную).

#### 2.4.10. Определение содержания воды в образцах PLGA-Dox

Содержание воды в лиофилизированных образцах НЧ влияет на сроки хранения и свойства наносомальной формы, поскольку избыточная влажность может вызывать протекание процессов разрушения матрицы НЧ в результате гидролиза, что может вызывать нежелательное высвобождение ЛВ в процессе хранения, а также потерю агрегативной устойчивости НЧ в восстановленной наносуспензии.

Для определения влагосодержания использовали термогравиметрический метод (ТГА), основанный на измерении веса образца при высушивании, который при нагревании снижается за счет испарения влаги. Исследование содержания влаги в образцах наночастиц проводили методом термогравиметрии с использованием термоанализатора TGA/DSC 3+ Mettler Toledo в лаборатории № 21 "Модификации полимеров" им. Н.А. Платэ (Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук). Для анализа использовали следующую

программу нагрева: изотерма 5 мин при +25 °С, далее нагрев от +25 °С до +200 °С со скоростью 5 °С/мин; среда – азот (30 мл/мин); тигель из Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> объемом 150 мкл.

Кроме того, поскольку значения влажности, полученные методом ТГА, включают в себя содержание остаточных органических растворителей (дихлорметан), которые могут присутствовать в лиофилизате НЧ, определение влагосодержания проводили также методом кулонометрического титрования по К. Фишеру на титраторе Фишера с генерирующим электродом без диафрагмы 831 KF Coulometer (Metrohm, Швейцария), оснащенным печью 860 KF Thermoprep (Metrohm, Швейцария); исследование выполняли на базе РХТУ имени Д.И. Менделеева. Около 0,05 г лиофилизата НЧ взвешивали в сосуде для проб, который укупоривали пробкой и металлическим колпачком и помещали в печь (тип газа – это сухой воздух; скорость потока – 100 мл/мин; температура +150 °С). Воду, высвобождаемую из пробы в печи, определяют методом кулонометрического титрования по К. Фишеру до установления конечной точки титрования: титрант – анодный раствор для кулонометрического титрования по методу Фишера Аква М®-Кулон АГ. (Кат. № 836. ТУ 2638-001-33699038-131-09, Россия); время экстракции составляло 300 сек; поляризационный ток – 10 мкА.

#### 2.4.11. Изучение стабильности PLGA-Dox и плацебо-PLGA НЧ при хранении

Для оценки стабильности полученных наночастиц PLGA-Dox и плацебо-PLGA в случае хранения при температуре холодильника (+5±2 °С) проводили измерение основных физико-химических параметров, определяющих качество наносомальной лекарственной формы: время ресуспендирования лиофилизата; размер и распределение НЧ по размерам; количественное содержание доксорубина и его примесей; степень включения доксорубина в НЧ. Оценку показателей проводили через 3 и 6 месяцев после начала исследования стабильности при условиях хранения.

### 2.5. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vitro*

Профиль высвобождения ЛВ *in vitro* является ключевой характеристикой наноразмерных носителей, определяющей эффективность препарата *in vivo*. Кинетика высвобождения доксорубина из образцов PLGA-Dox НЧ, полученных в различных условиях, была изучена в различных простых модельных средах и плазме крови человека. Математический анализ экспериментальных кинетических кривых *in vitro* проводили с помощью известных математических моделей (нулевого порядка, первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла,

Корсмейера-Пеппаса и др.), описывающих высвобождение лекарственных веществ из матриц различной химической природы.

### 2.5.1. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц в простые модельные среды *in vitro*

Для количественной оценки профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц был оценен широкий спектр приемных сред: исследовали влияние состава приемной среды, температуры инкубации, а также разведения суспензии наночастиц. Для оценки содержания свободного (не связанного с носителем) доксорубина (%) наночастицы отделяли методами центрифугирования и диализа с последующим количественным определением доксорубина в супернатантах.

#### 2.5.1.1. Метод центрифугирования

Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1 мл приемной среды, затем разбавляли тем же раствором до объема 25 мл (т.е. до концентрации доксорубина  $\approx 68-70$  мкг/мл) с последующей инкубацией при температуре  $+37$  °С и непрерывном встряхивании (200 об/мин) в шейкере-инкубаторе ES-20 (ООО «Biosan», Латвия). Через заданные интервалы времени (1, 2, 3, 4, 6, 24, 48 и 120 ч) отбирали аликвоты по 1,5 мл, и НЧ отделяли центрифугированием при  $48254 \times g$ , 30 мин,  $+5$  °С, центрифуга Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США). Для выбора оптимальных условий осаждения НЧ центрифугировали также при меньшем ускорении ( $15000 \times g$ , 30 мин,  $+18$  °С, центрифуга Eppendorf 5804R, Германия), при этом оценивали влияние объема центрифугируемой суспензии (0,5-1,5 мл) на эффективность осаждения НЧ. Кроме того, кинетику высвобождения изучали также при разбавлении исходной суспензии в 5 раз (т.е. до концентрации доксорубина  $\approx 330$  мкг/мл). Также оценивали влияние температуры инкубации ( $+25$  °С,  $+37$  °С) на профиль высвобождения доксорубина.

Оптимизацию метода центрифугирования проводили также путем варьирования состава приемной среды: вода; 0,9% раствор хлорид натрия; PBS (pH=7,4); 1 % раствор полоксамера 188, 1 % раствор полисорбата 80. Кроме того, для оценки влияния pH на скорость высвобождения доксорубина из НЧ, в качестве приемной среды были использованы следующие буферные растворы: HEPES буфер (0,1 моль/л, pH=7,4); MES буфер (0,1 моль/л, pH=6,5); натрий-ацетатный буферный раствор (0,1 моль/л, pH=4,5). Для приготовления HEPES буфера к 10 мл 1М буферного раствора HEPES (1 М, pH 7,0-7,6) прибавляли 80 мл деионизированной воды, доводили pH до 7,4 при помощи 1 н. NaOH, а затем водой до 100 мл. Для

приготовления MES буфера 1,952 г MES растворяли в 80 мл деионизованной воды, доводили до pH=6,5 при помощи 1н. NaOH, затем доводили водой до 100 мл. Для приготовления натрий-ацетатного буфера 1,846 г безводного натрия ацетата ( $M=82,03$  г/моль) или 3,062 г натрия ацетата тригидрата (136,08 г/моль) растворяли в 400 мл деионизованной воды, прибавляли 1,57 мл ледяной уксусной кислоты ( $\rho=1,0492$  г/см<sup>3</sup>, то есть 1,651 г), доводили до pH=4,5 при помощи 1 н. NaOH, далее разбавили водой до 0,5 л.

Концентрацию доксорубицина в супернатанте измеряли спектрофотометрически с использованием калибровочной кривой в соответствующей приемной среде при длине волны 481 нм: в воде в диапазоне от 0,00 до 52,50 мкг/мл ( $A=0,0181 \times C$ ;  $R^2=0,9979$ ); в 1 % растворе полоксамера 188 в диапазоне от 0,00 до 59,90 мкг/мл ( $A=0,0198 \times C$ ;  $R^2=0,9994$ ); в 1 % растворе полисорбата 80 в диапазоне от 0,00 до 51,00 ( $A=0,0209 \times C$ ;  $R^2=0,9995$ ); в PBS в диапазоне от 0,00 до 52,00 ( $A=0,0168 \times C$ ;  $R^2=0,9995$ ); в 0,9 % растворе натрия хлорида в диапазоне от 0,00 до 50,00 ( $A=0,0179 \times C$ ;  $R^2=0,9991$ ); в HEPES буфере в диапазоне от 0,00 до 50,00 мкг/мл ( $A=0,0194 \times C$ ;  $R^2=0,9999$ ); в MES буфере в диапазоне от 0,00 до 50,00 мкг/мл ( $A=0,0178 \times C$ ;  $R^2=0,9996$ ); в натрий-ацетатном буфере в диапазоне от 0,00 до 50,00 мкг/мл ( $A=0,01893 \times C$ ;  $R^2=0,9999$ ). Каждое измерение проводили параллельно для 3 образцов. Содержание свободного доксорубицина (%) рассчитывали относительно его исходного общего содержания по уравнению (11):

$$\text{Свободный доксорубицин (\%)} = \frac{M_t}{M_{\infty}} \times 100\% \quad (11)$$

где  $M_t$  – содержание доксорубицина в супернатанте в определенный момент времени;  $M_{\infty}$  – общее содержание доксорубицина.

Для оценки эффективности осаждения НЧ при исследовании профиля высвобождения содержание PLGA в супернатантах определяли методом КЭФ после щелочного гидролиза, как описано выше (2.4.6.1).

#### 2.5.1.2. Метод диализа

Высвобождение доксорубицина из PLGA-Dox НЧ в воде также оценивали при отделении НЧ методом диализа через мембрану Spectra-Por® Float-A-Lyzer® G2 (50 кДа, объем 1 мл, 10 мм × 5 см, Spectrum Laboratories Inc, США). Мембрану предварительно инкубировали в растворе доксорубицина (70 мкг/мл) в течение 2 дней, затем ее тщательно промывали. Для оценки десорбции доксорубицина мембрану затем инкубировали при +37 °С в 25 мл воды в течение 48

ч. Значения поглощения находились на уровне 0,040 в фильтрате и 0,023 внутри мешка (на уровне погрешности измерений). В подготовленную таким образом диализную мембрану помещали 1 мл суспензии НЧ и 25 мл воды (Milli-Q). Мембрану инкубировали в аналогичных условиях. Концентрацию доксорубицина в приемной среде измеряли спектрофотометрически через 1, 2, 3, 4, 6, 24, 48, 72, 96 и 144 ч при использовании калибровочной кривой в воде, как описано выше. В каждой временной точке приемную среду полностью заменяли. Содержание свободного доксорубицина (в %) рассчитывали относительно его исходного общего содержания как описано в 2.4.6.1.

#### 2.5.2. Изучение профиля высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox наночастиц в плазме крови человека *in vitro*

Для изучения профиля высвобождения доксорубицина из наночастиц *in vitro* в плазме была разработана биоаналитическая методика количественного определения свободного и связанного с наночастицами доксорубицина в плазме крови (ВЭЖХ); для оптимизации методики изучены различные варианты пробоподготовки.

Объединенная плазма крови человека была любезно предоставлена клиническим центром ПМГМУ им. И.М. Сеченова. (Москва, Россия) и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия). Метод определения содержания свободного доксорубицина (%) в плазме крови человека основан на разделении свободного и связанного с наночастицами доксорубицина путем центрифугирования образцов плазмы крови, с дальнейшей экстракцией аналита (доксорубицин) путем осаждения белков крови и последующим анализом свободного доксорубицина с помощью ВЭЖХ со диодно-матричным детектированием при длине волны 254 нм. В качестве внутреннего стандарта (ВС) использовали даунорубицин (EP CRS, 98,5%, EDQM). В ходе предварительного исследования были оценены различные методы экстракции и различные режимы центрифугирования для отделения НЧ. Для выбора скорости центрифугирования ( $15000 \times g/48254 \times g$ ) и типа экстрагента (100% ацетонитрил + 0,1 % муравьиная кислота/ацетонитрил:ДМСО 1:1 + 0,1 % муравьиная кислота) определяли содержание общего (свободного и связанного с НЧ) и свободного доксорубицина в плазме для трех уровней концентрации (10, 50 и 100 мкг/мл).

##### 2.5.2.1. Приготовление калибровочных стандартов и образцов PLGA-Dox НЧ

Исходные растворы гидрохлорида доксорубицина (1 мг/мл, EP CRS, 99,0%, EDQM) и внутреннего стандарта (ВС) даунорубицина (10 мг/мл, EP CRS, 98,5%, EDQM) готовили путем

растворения точных навесок соответствующих стандартов в воде. Исходные растворы были разделены на 5 аликвот и помещены на хранение при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Далее, 100 мкл исходного раствора ВС разбавляли 25 мл 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты (МК) для получения рабочего раствора ВС (40 мкг/мл), который затем разделяли на 20 аликвот и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Для построения калибровочной кривой 7 стандартных калибровочных растворов с концентрациями химического стандарта доксорубицина от 2 до 100 мкг/мл, образец с нулевой концентрацией доксорубицина (бланк), были приготовлены с использованием объединенной плазмы человека и проанализированы в течение 2-х независимых аналитических серий. В результате анализа была выявлена линейная зависимость отклика детектора от концентрации анализируемого вещества. Схема приготовления 10-кратных растворов калибровочных стандартов показана в таблице 7. Растворы для калибровочных стандартов готовили из отдельных аликвот основного раствора.

Таблица 7 – Схема приготовления 10-кратных растворов для калибровки в плазме

<i>Приготовление исходных растворов:</i>					
<b>Конц-я раствора доксорубицина, мкг/мл</b>		<b>Схема приготовления</b>			
<b>100</b>		40 мкл [р-ра доксорубицина 1 мг/мл] + 360 мкл [АЦН:Н <sub>2</sub> O (1:1) + 0,1 % МК]			
<i>Приготовление 10х стандартных растворов</i>					
<b>Маркировка образца</b>	<b>Конц-я в плазме, мкг/мл</b>	<b>Конц-я 10х р-ров, мкг/мл</b>	<b>Исходные растворы, мкг/мл</b>	<b>Объем исходных растворов, мкл</b>	<b>Объем добавленного АЦН:Н<sub>2</sub>O (1:1) + 0,1 % МК, мкл</b>
K1	2	20	100	20	80
K2	4	40	100	40	60
K3	10	100	100	100	-
K4	20	200	1000	20	120
K5	40	400	1000	40	60
K6	80	800	1000	80	20
K7	100	1000	1000	100	-

Исходные суспензии наночастиц, нагруженных доксорубицином (1 мг/мл), были получены путем ресуспендирования лиофилизированных образцов в 1 % водном растворе полоксамера 188 с последующей 30-минутной инкубацией при температуре окружающей среды. Процедура приготовления 10-кратных растворов НЧ, нагруженных доксорубицином,

показана в таблице 8.

Таблица 8 – Схема приготовления 10-кратных суспензий PLGA-Dox НЧ

Концентрация доксорубицина в плазме, мкг/мл	Концентрация доксорубицина в 10-кратной суспензии НЧ, мкг/мл	Концентрация доксорубицина в исходной суспензии НЧ, мкг/мл	Объем исходной суспензии, мкл	Объем добавленного АЦН:Н <sub>2</sub> О (1:1) + 0,1 % МК, мкл
10	100	1000	100	900
50	500	1000	500	500
100	1000	1000	500	-

10-кратные суспензии PLGA-Dox НЧ готовили из отдельных аликвот исходной суспензии с содержанием доксорубицина 1 мг/мл.

2.5.2.2. Методика подготовки образцов, используемая для определения общей концентрации доксорубицина в плазме человека для калибровки и образцов наночастиц PLGA

Объединенную плазму человека размораживали при комнатной температуре и перемешивали при помощи встряхивателя Vortex. В пробирки на 1,5 мл переносили 200 мкл плазмы, добавляли 20 мкл соответствующего 10-кратного калибровочного стандартного раствора доксорубицина или 10-кратной суспензии PLGA-Dox НЧ объемом 20 мкл, за исключением бланк-раствора (без аналита), осторожно перемешивали в течение 2 мин при температуре +4 °С с помощью ThermoMixer C (Eppendorf AG, Германия). В случае бланк-раствора добавляли 20 мкл смеси АЦН:вода (1:1) + 0,1 % МК. К образцам добавляли 80 мкл рабочего раствора ВС (даунорубицин, 40 мкг/мл), за исключением холостых проб (без аналита и ВС). В случае холостых проб добавляли 80 мкл смеси АЦН:вода (1:1) + 0,1 % МК. Для экстракции доксорубицина (и ВС) добавляли 300 мкл охлажденного (-20 °С) 0,1 % раствора муравьиной кислоты в ацетонитриле (АЦН + 0,1 % МК) с последующим перемешиванием образцов при 1200 об/мин в течение 2 мин. После этого добавляли 300 мкл ДМСО, перемешивали при 1200 об/мин в течение 8 мин. Образцы центрифугировали в течение 30 минут при 4000 об/мин и температуре + 4 °С (Eppendorf 5804R, Германия). Далее 250 мкл супернатанта смешивали с 250 мкл смеси АЦН:вода (62,5:37,5, об./об.) с добавлением 0,1 % МК и анализировали методом ВЭЖХ. Концентрации общего доксорубицина в плазме рассчитывали с использованием калибровочной кривой с нормализацией по ВС (даунорубицин).

Кроме того, экстракцию доксорубицина проводили с использованием АЦН с

добавлением 0,1 % МК (экстракция без ДМСО). В этом случае, для экстракции доксорубицина (и ВС) к образцам добавляли 600 мкл охлажденного (-20 °С) раствора экстрагента. После встряхивания образцов при 1200 об/мин в течение 10 минут их центрифугировали в течение 30 минут при 4000 об/мин и температуре +4 °С (Eppendorf 5804R, Германия). Далее 250 мкл супернатанта смешивали с 250 мкл смеси АЦН:вода (25:75, об./об.) с добавлением 0,1 % МК перед дальнейшим анализом с помощью ВЭЖХ.

#### 2.5.2.3. Методика подготовки образцов, используемая для определения концентрации свободного доксорубицина в плазме человека

Для изучения влияния центробежного ускорения (15000 x g или 48254 x g) на процент свободного доксорубицина в плазме крови объединенную плазму размораживали при комнатной температуре и перемешивали при помощи встряхивателя Vortex. В первом случае, 600 мкл плазмы переносили в пробирки объемом 1,5 мл, добавляли 60 мкл 10-кратной суспензии PLGA-Dox НЧ и осторожно перемешивали. Образцы центрифугировали в течение 30 мин при ускорении 15000 x g и температуре +4 °С с использованием центрифуги Eppendorf 5804R (Eppendorf AG, Германия). Во втором случае, 1 мл объединенной плазмы переносили в пробирки для центрифугирования объемом 10 мл, далее добавляли 100 мкл 10-кратной суспензии PLGA-Dox НЧ и осторожно перемешивали. Образцы центрифугировали в течение 30 мин при ускорении 48254 x g и температуре +4° С с использованием центрифуги Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США).

В обоих случаях 220 мкл супернатанта осторожно переносили в пробирки на 1,5 мл, и выполняли пробоподготовку, как описано ранее для общего доксорубицина (с использованием ацетонитрила с добавлением 0,1 % МК или смеси ацетонитрила с ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % МК).

#### 2.5.2.4. Параметры ВЭЖХ анализа

Для количественного определения доксорубицина (свободного и общего) в плазме человека использовали метод ВЭЖХ с обращенной фазой. Анализ проводили с использованием системы ВЭЖХ LC-20 (Shimadzu, Япония), оснащенной диодно-матричным детектором и колонкой Waters Symmetry (C18, 5 мкм, 3,9x150 мм, Milford, США), детектирование проводили при длине волны 254нм. Разделение проводили в изократическом режиме элюирования (20 мин) смесью подвижных фаз (ПФ) А и Б (55:45, об./об.), скорость потока ПФ 1,0 мл/мин, температура колонки составляла 25 °С. ПФ А представляла собой раствор АЦН в воде (40%,

объем/объем), содержащий 2,88 г/л додецилсульфата натрия и 2,25 г/л ортофосфорной кислоты; объем вкола составлял 10 мкл. Для приготовления ПФ А 2,88 г натрия додецилсульфата помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляли 2,25 г фосфорной кислоты концентрированной, перемешивали, прибавляли 200 мл воды для хроматографии, перемешивали, прибавляли 400 мл АЦН для хроматографии, перемешивали, доводили объем раствора водой для хроматографии до метки, перемешивали, фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (капрон) и дегазировали. Материал мембранного фильтра – капрон или другой совместимый с полученным раствором. ПФ Б представляла собой раствор АЦН в воде с объемной концентрацией АЦН 60%. Для приготовления ПФ Б 600 мл АЦН для хроматографии помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляли 300 мл воды для хроматографии, перемешивали, нагревали до комнатной температуры, доводили объем раствора водой для хроматографии до метки, перемешивали, фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм и дегазировали.

Предел количественного определения (LOQ) составлял 1,95 мкг/мл. В плазме коэффициент вариации прецизионности и точности был менее 15%, а степень экстракции составила 96-104%. Концентрации доксорубина были рассчитаны в соответствии с калибровочной кривой, построенной с использованием стандарта доксорубина гидрохлорида (99,0%, EDQM) как описано выше, с нормализацией по внутреннему стандарту (даунорубина гидрохлорид, 98,5%, EDQM) по уравнению (12):

$$\frac{S_{\text{Доксорубин}}}{S_{\text{ВС}}} = 0,0628 \times C_{\text{Доксорубин}} + 0,0219 \quad (12)$$

где  $C_{\text{Доксорубин}}$  – концентрация доксорубина в плазме [мкг/мл],  $S_{\text{Доксорубин}}/S_{\text{Доксорубин}}$  – отношение площади пика доксорубина к площади пика внутреннего стандарта;  $R^2=0,9999$ . Все измерения повторяли трижды ( $n=3$ ).

#### 2.5.2.5. Методика изучения профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц в плазме крови *in vitro*

Высвобождение доксорубина *in vitro* из PLGA-Dox НЧ оценивали в плазме крови человека, любезно предоставленной клиническим центром ПМГМУ им. И.М. Сеченова и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия). Параметры методики определения профиля высвобождения доксорубина из НЧ были выбраны на основании предварительных экспериментов по оптимизации метода количественного

определения свободного и общего доксорубицина в плазме (2.4.8.2 и 2.4.8.3)

Свежезамороженную плазму размораживали при комнатной температуре. Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в воде MilliQ и дополнительно разбавляли плазмой до концентрации доксорубицина  $\approx 68$  мкг/мл и конечного объема 25 мл с последующей инкубацией при 37 °С при непрерывном встряхивании. Через заданные интервалы времени (15 мин, 1, 2, 4, 6, 24 и 48 ч) отбирали аликвоты по 1,5 мл, и НЧ отделяли центрифугированием при  $48254 \times g$  в течение 30 мин при +4 °С с использованием центрифуги Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США), отбирали 300 мкл супернатанта в пробирку на 1,5 мл; образцы хранили при -70 °С. Непосредственно перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре, перемешивали на встряхивателе Vortex. Затем 220 мкл переносили в пробирку на 1,5 мл, добавляли в качестве внутреннего стандарта 80 мкл раствора даунорубицина с концентрацией 40 мкг/мл и перемешивали на шейкере (1200 об/мин, 2 мин). Доксорубин (и ВС) экстрагировали как описано ранее смесью АЦН с ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % МК и анализировали с помощью ВЭЖХ (система HPLC Shimadzu, колонка Symmetry C18, 5 мкм, 3,9 x 150 мм) с диодно-матричным детектированием (при длине волны 254 нм) как описано выше.

Содержание свободного доксорубицина в плазме (%) рассчитывали относительно исходного общего содержания доксорубицина ( $M_t/M_\infty \times 100\%$ ). Стабильность доксорубицина контролировали на основании хроматограмм, полученных в разные моменты времени. Вместо нагруженных доксорубицином наночастиц PLGA в качестве контроля использовали раствор гидрохлорида доксорубицина в соответствующей концентрации. Все измерения повторяли трижды.

### 2.5.3. Математическое описание кинетики высвобождения доксорубицина из наночастиц *in vitro*

Математическое описание и сравнение профилей высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ проведено с помощью основных математических моделей, описывающих кинетику высвобождения ЛВ из полимерной матрицы, в том числе модели нулевого и первого порядков, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса и др. Однако, допущения, лежащие в основе традиционных моделей высвобождения ЛВ матрицы носителя, часто не учитывают изменений, которые не согласуются с физическими теориями эрозии, растворения и диффузии ЛВ из матрицы. Для анализа профилей высвобождения была также использована модель 3RPT (*англ.* 3-parametric reciprocal powered time model) [172]. 3RPT математическая модель была разработана и адаптирована для настоящего исследования группой проф. Маттиаса Г. Вакера (Национальный университет Сингапура), и впоследствии использована для анализа полученных

экспериментальных данных кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ. Первоначально модель RPT была разработана для контроля качества твердых лекарственных форм; хотя она основана на процессе растворения и диффузии, модель вводит две переменные (m, b) для учета влияния гидродинамики и агрегации частиц в процессе высвобождения [173]. Модель 3RPT вводит третий параметр высвобождения (c) для моделирования биорелевантного высвобождения при отсутствии условий «условия достаточного разбавления» (англ. sink conditions) и находит широкое применение в большом количестве биорелевантных исследований [172; 174; 153]. Модели, примененные к полученным кинетическим кривым высвобождения *in vitro*, представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Параметры математических моделей для анализа кинетических кривых высвобождения доксорубина из PLGA-Dox *in vitro*

Модель	Уравнение
Модель нулевого порядка	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 \times t$
Модель первого порядка	$\ln\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right) = -K_1 \times t$
Модель Хигучи	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \times t^{\frac{1}{2}}$
Модель Хиксона-Кроуэлла	$\left(1 - \frac{M_t}{M_\infty}\right)^{\frac{1}{3}} = 1 - K_\beta \times t$
Корсмейера-Пеппаса	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_{KP} \times t^n$
3RPT модель (англ. 3-parametric reciprocal powered time model)	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{t^b}{t^b + m} * c$

#  $M_t$  – количество ЛВ, высвобождаемое за определенное время (t);  $M_\infty$  – общее количество ЛВ; n – диффузионный коэффициент в уравнении Корсмейера-Пеппаса; в рамках 3RPT модели параметр m представляет собой время, за которое было достигнуто 50% фазы плато, параметр b определяет форму профиля, c - высвобожденную долю ЛВ в фазе плато.

Поскольку высвобождение доксорубина из НЧ имеет двухфазный характер, для математического анализа кривые высвобождения разделили на 2 участка: фаза быстрого высвобождения (1-6 ч) и фаза медленного высвобождения (6-120 ч), а также проанализировали кривую за все время выделения доксорубина (1-120 ч). Чтобы сравнить кинетику высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц до и после очистки от доксорубина, с помощью перечисленных моделей выполнено сравнение 48-часовых профилей высвобождения.

## 2.6. Изучение гидролитической деградации PLGA-Dox и плацебо-PLGA НЧ и параметров, влияющих на скорость деградации

Для изучения кинетики деградации PLGA НЧ использовали метод капиллярного зонального электрофореза (КЭФ) как описано выше (2.4.4). Процесс гидролитической деградации PLGA-Dox и плацебо-PLGA наночастиц изучали в 50 мМ фосфатном буфере (PBS, pH=7,4). Лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1 мл буфера, затем разбавляли до объема 25 мл (т.е. до концентрации доксорубицина  $\approx$  68-70 мкг/мл) с последующей инкубацией при температуре +37 °С и непрерывном встряхивании (200 об/мин) в шейкере-инкубаторе ES-20 (ООО «Biosan», Латвия). Через определенные промежутки времени (0, 2, 4, 6, 24, 48, 72, 120, 144 ч) отбирали аликвоты по 500 мкл суспензии, а затем отделяли НЧ методом ультрафильтрации с использованием фильтров AmiconVR® Ultra-0.5 (Merck Millipore Ltd Millipore, Ирландия) из восстановленной целлюлозы с размером пор 100 кДа (NMWL) на центрифуге Eppendorf 5804R (15000  $\times$  g, 20 мин, +25 °С). Отбирали 100 мкл фильтрата и добавляли 10 мкл 1,0 н. NaOH и инкубировали в течение 24 ч в шейкере-инкубаторе (200 об/мин, +37 °С) для проведения полного щелочного гидролиза всех компонентов. Далее гидролизат разбавляли в 10 раз водой Milli-Q; общее содержание продуктов деградации – мономеров молочной кислоты определяли, как описано ранее в разделе 2.4.4 методом КЭФ. Концентрации определяли по пику молочной кислоты на электрофореграмме с использованием калибровочных кривых, построенных для полностью гидролизованных образцов PLGA с известной концентрацией. Степень деградации полимера определяли по отношению концентраций PLGA (%) в супернатанте к общему содержанию PLGA в образце наночастиц (2.4.4).

### 2.6.1. Изучение параметров полимеров, используемых для получения наночастиц

Для оценки влияния незначительных различий в молекулярной массе PLGA на профиль гидролитической деградации наночастиц, и, соответственно, профиль высвобождения из них доксорубицина, применяемые для получения НЧ сополимеры молочной и гликолевой кислот с соотношением звеньев лактид-гликолид 50:50 с концевыми кислотными группами, в том числе Resomer® 502H (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия), Lactel® (Lactel Absorbable Polymers, США) и Purasorb® PDLG 5002A (Corbion, Нидерланды), были предварительно охарактеризованы в остаточного содержания мономера, кислотного числа и характеристической вязкости; данные исследования были выполнены на базе РХТУ имени Д.И. Менделеева. Кроме того, исследование молекулярно-массового распределения полимеров методом ГПХ было выполнено в Институте нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева

Российской академии наук (ИНХС РАН).

Содержание водорастворимой фракции в образцах PLGA определяли методом КЭФ. Для этого водорастворимую фракцию полимера экстрагировали из раствора полимера в дихлорметан и затем гидролизовали до молочной и гликолевой кислот. Точную навеску полимера (100 мг) полностью растворяли в 1,0 мл дихлорметана, затем в пробирку добавляли 2,5 мл дистиллированной воды и интенсивно перемешивали в течение 5 мин для экстракции водорастворимой фракции. Затем смесь оставляли на 24 ч при +25 °С для разделения фаз, 100 мкл верхней водной фазы переносили в пробирку на 1 мл, добавляли 10 мкл 1,0 н. NaOH и инкубировали в течение 24 ч (200 об/мин, +37 °С). После этого производили 10-кратное разбавление гидролизата и измеряли содержание мономера методом КЭФ как описано ранее в разделе 2.4.4.

Для определения кислотного числа (КЧ) полимеров использовали метод неводного титрования; в качестве индикатора использовали 1 % раствор фенолфталеина в 96% этаноле. В качестве титранта использовали 0,01 М спиртовой раствор калия гидроксида (KOH), стандартизацию титранта проводили по янтарной кислоте. Точную навеску полимера (50 мг) растворяли в 4 мл дихлорметана, добавляли 25 мкл раствора индикатора и титровали до появления стойкого розового окрашивания. КЧ полимера рассчитывали по формуле (13):

$$\text{КЧ} = \frac{56,1 \cdot V(\text{KOH}) \cdot C_n(\text{KOH})}{m} \quad (13)$$

где КЧ - кислотное число [мг KOH / г полимера]; 56,1 – молярная масса эквивалента KOH [г/моль-экв.]; V(KOH) – объем раствора титранта, используемого для титрования [мл]; C<sub>n</sub>(KOH) – нормальность (эквивалентная концентрация) титранта [моль-экв./л], m – масса образца полимера (г). Все измерения выполняли четыре раза для каждого образца, результаты усредняли.

Кроме того, проводили определение молекулярной массы полимера путем измерения характеристической вязкости. Вязкость растворов полимеров измеряли с помощью капиллярного вискозиметра Уббеллоде (Ubbelohde) с диаметром капилляра 0,56 мм. Метод измерения вязкости при помощи капиллярного вискозиметра основан на подсчёте времени протекания заданного объёма жидкости через узкое отверстие или трубку, при заданной разнице давлений. Через стеклянный фильтр в вискозиметр наливали 14 мл ТГФ и инкубировали на водяной бане при температуре +22,5 °С в течение нескольких минут. Проводили измерения для растворителя до тех пор, пока три последовательных значения не отличались от среднего значения на ≤ 0,2 с. Затем регистрировали время протекания

испытуемых растворов PLGA с концентрацией 10 г/дл: 14 мл раствора полимера наливали в вискозиметр и термостатировали, а затем измеряли время вытекания раствора. Затем раствор в вискозиметре разбавляли ТГФ, перемешивали и процесс измерения повторяли.

Относительную, удельную и приведенную вязкость рассчитывали по уравнениям (14-16):

$$\eta_r = \frac{t}{t_0} \quad (14)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (15)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (16)$$

где  $\eta_r$  – относительная вязкость;  $t$  и  $t_0$  – время вытекания испытуемого раствора полимера и растворителя, соответственно (сек),  $\eta_{sp}$  – удельная вязкость;  $\eta_{red}$  – приведенная вязкость;  $C$  – концентрация раствора полимера (г/дл).

Для расчета характеристической вязкости  $[\eta]$  строили график зависимости приведенной вязкости ( $\eta_{red}$ ) от концентрации раствора полимера ( $C$ ); значение  $\eta$  рассчитывали путем экстраполяции графика приведенной вязкости к нулевой концентрации. Уравнение Марка-Куна-Хаувинка (Mark-Houwink) использовали для расчета средневязкостной молекулярной массы с использованием констант для PLGA (50:50) при заданных условиях (17):

$$[\eta]=K \cdot M^\alpha \quad (17)$$

где  $[\eta]$  – характеристическая вязкость (дл/г),  $M$  – средневязкостная молекулярная масса (Да),  $K=1,07 \times 10^{-4}$  и  $\alpha=0,761$  – константы для раствора PLGA в ТГФ [175].

Молекулярно-массовое распределение полимеров определяли также методом ГПХ на хроматографе высокого давления, оснащенный системой колонок Styragel HR 5E, HR 4E (300 × 7,8 мм) и рефрактометрическим детектором Waters 2414 (Waters Corporation, США). Скорость потока ПФ составляла 1,0 мл/мин; в качестве растворителя для проб и элюента использовали тетрагидрофуран (ТГФ). Концентрация полимера в образцах составляла примерно 1 мг/мл; объем вводимой проб – 100 мкл. В качестве калибровочных стандартов использовали стандарты полистирола. Перед анализом образцы фильтровали через CHROMAFIL® Xtra PTFE (2 мкм). Все измерения выполняли трижды для каждого образца, результаты усредняли ( $n=3$ ).

Температуру стеклования ( $T_g$ ) измеряли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) на калориметре Mettler TA-4000 (Mettler Toledo GmbH, Германия) с измерительной ячейкой DSC-30. Образцы точно взвешивали в алюминиевых чашах, плотно

закрывали и подвергали циклам охлаждения и нагрева со скоростью 10 °С/мин. Исследование выполнено в лаборатории № 21 "Модификации полимеров" им. Н.А. Платэ (Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева Российской академии наук).

## 2.7. Изучение сорбции полуксамера 188 на поверхности PLGA-НЧ

Для количественной оценки сорбции полуксамера 188 на поверхности PLGA НЧ, нагруженных доксорубицином, в процессе модификации при подготовке к *in vivo* исследованиям, был применен модифицированный йодометрический метод, описанный ранее [5]. В его основе лежит взаимодействие полуксамера 188 с йодом, приводящее к образованию окрашенных соединений с характерным максимумом поглощения на длине волны 501 нм [176].

Методика оценки сорбции полуксамера 188 включала в себя 4 стадии. Вначале проводили двукратную отмывку наночастиц от ПВС центрифугированием ( $48254 \times g$ , 30 мин, +5 °С) с использованием центрифуги Eppendorf 5804R. Затем наночастицы инкубировали с раствором полуксамера 188 в течение определенного времени (0,5, 1 и 24 ч), НЧ отделяли центрифугированием ( $48254 \times g$ , 30 мин, +5 °С). Супернатант, содержащий несвязанный полуксамер 188, повторно центрифугировали ( $48254 \times g$ , 30 мин, +18 °С). Далее отделяли свободный доксорубицин от полуксамера 188 на хроматографической колонке, заполненной Sephadex® G-25. Количественное содержание полуксамера 188 в элюате определяли йодометрическим методом (спектрофотометрия); интервал определяемых концентраций составил 2-16 мкг/мл. Расчет сорбции полуксамера 188 (мкг/м<sup>2</sup>) проводили по разнице между содержанием полуксамера 188 в растворе до инкубации и после инкубации с НЧ относительно площади поверхности НЧ.

Площадь поверхности полимера в наночастицах рассчитывали по следующим формулам (18-20):

$$S = S_{\text{НЧ}}N = 4\pi R^2N \quad (18)$$

$$N = \frac{m}{m_{\text{НЧ}}} = \frac{m}{\rho V} = \frac{m}{\frac{4}{3}\pi\rho R^3} \quad (19)$$

или

$$S = \frac{3m}{\rho R} \quad (20)$$

где  $S_{\text{НЧ}}$  – площадь поверхности одной наночастицы, м<sup>2</sup>; N – число наночастиц в данном образце; R – гидродинамический радиус наночастицы (метод DLS, Zetasizer Nano NanoZS), м; m – масса полимера, определённая экспериментально (КЭФ), кг;  $m_{\text{НЧ}}$  – масса одной наночастицы, кг;  $\rho$  – плотность полимера, определённая экспериментально, кг/м<sup>3</sup>.

Для определения плотности Resomer® 502Н навеску сополимера расплавили на чашке Петри при + 60 °С, сформировали комочек, остудили, взвесили. В шприц на 3 мл, загерметизированный снизу, поместили 2 мл дистиллированной воды и зафиксировали уровень жидкости. Охлажденный кусочек сополимера поместили в шприц с водой. После того, как кусочек погрузился на дно шприца, отметили новый уровень жидкости. Измерили объем и вес воды, соответствующий разнице двух уровней жидкости в шприце. Для расчета плотности сополимера использовали формулу:  $\rho = M/V$ . Плотность для Resomer® 502Н составила  $1,19 \pm 0,02$  г/см<sup>3</sup> (P = 0,95; n = 4), SD = 0,02.

## 2.8. Оценка гемолитической активности PLGA-Dox наночастиц

Исследование гемолитической активности наночастиц проводили на кафедре медицинских нанобиотехнологий ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. Гемолитическую активность НЧ оценивали *ex vivo* с помощью колориметрического метода по адаптированной методике [177]. Гемолитическую активность PLGA-Dox НЧ оценивали в отношении эритроцитов крови человека. Цельная человеческая кровь (антикоагулянт ЭДТА-К2) была любезно предоставлена НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия).

Образцы крови центрифугировали с помощью центрифуги Eppendorf 5804R (900 ×g, 10 мин, +18 °С). Эритроциты промывали дважды фосфатным буфером (PBS) и затем ресуспендировали в PBS до содержания эритроцитов  $4 \times 10^9$  клеток в мл, что соответствует концентрации эритроцитов в крови здорового человека). Готовили серию разведений 20-кратных суспензий наночастиц в PBS, 50 мкл соответствующей суспензии добавляли к 950 мкл суспензии эритроцитов ( $4 \times 10^9$  клеток/мл) до конечной концентрации доксорубина в диапазоне от 0,195 до 200 мкг/мл (0,195; 0,39; 0,785; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25, 50, 100 и 200 мкг/мл) и инкубировали в шейкер-инкубаторе при температуре +37 °С в течение 2 часов. В качестве отрицательного контроля вместо 50 мкл суспензии НЧ к суспензии эритроцитов добавляли 50 мкл PBS. В качестве положительного контроля к 950 мкл суспензии эритроцитов добавляли 50 мкл PBS, затем инкубировали 25 мкл аликвоты полученной суспензии с 975 мкл 1% TritonX-100 в аналогичных условиях (разбавление в 40 раз); n=5.

После инкубации образцы центрифугировали (900 × g, 5 мин, +18 °С), аликвоты супернатанта объемом 100 мкл переносили в 96-луночные планшеты. Для индукции образования гемихромов в экспериментальные образцы добавляли додецилсульфат натрия (конечная концентрация 0,06%). Количество гемоглобина в образце определяли, оценивая

оптическую плотность раствора при длине волны 540 нм при помощи планшетного анализатора EnSpire (PerkinElmer, США). Процент гемолиза рассчитывали, как отношение оптической плотности образца к оптической плотности положительного контроля ( $\times 40$ ),  $n=5$ .

## 2.9. Изучение связывания PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови человека

Фармакокинетические параметры ЛФ обычно определяют путем анализа концентрации ЛВ в плазме, а не в цельной крови. Параметры, определенные с использованием данных в плазме, могут вводить в заблуждение, если концентрации ЛВ в плазме и крови различаются вследствие разного связывания со специфическими компонентами в крови. Отношение общей концентрации ЛВ в цельной крови к его концентрации в плазме ( $K_{\text{Blood/Plasma}}$ ) и отношение общей концентрации доксорубина в эритроцитах (RBC) к его концентрации в плазме ( $K_{\text{RBC/Plasma}}$ ) являются параметрами, которые служат для оценки количества ЛВ, связанного с клеточной фракцией крови.

Для оценки и сравнения связывания свободного и наносомального доксорубина с эритроцитами крови человека данные параметры рассчитывали по адаптированному протоколу, описанному в [178]. При использовании данного метода тестируемое соединение вводят в свежую цельную кровь с антикоагулянтом и контрольную плазму в одной и той же концентрации. После инкубационного периода кровь центрифугируют и плазму (b-плазма, концентрация аналита  $C_p$ ) анализируют вместе с контрольной плазмой (концентрация аналита  $C_{cp}$ , при определенных допущениях имитирует концентрацию в крови ( $C_b$ )). В этом случае  $K_{\text{Blood/Plasma}}$  представляет собой отношение общей концентрации доксорубина в контрольной плазме ( $C_{cp}$ ) к общей концентрации доксорубина ( $C_p$ ) в b-плазме.

Цельная человеческая кровь была любезно предоставлена НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия). Образцы крови предварительно инкубировали при  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  в течение 10 минут. Для получения контрольной плазмы эритроциты отделяли путем центрифугирования цельной крови ( $1500 \times g$ , 10 мин,  $+20\text{ }^\circ\text{C}$ ) с использованием центрифуги Hettich Universal 320R с бакет-ротатором № 1628 (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия). Далее 100 мкл суспензии нагруженных доксорубином PLGA НЧ (отмытых / не отмытых от свободного доксорубина) или раствора доксорубина гидрохлорида (DOX, контроль) в 1 % растворе полоксамера 188 добавляли к 1 мл отобранной цельной крови и контрольной плазме до конечной концентрации 10, 50 или 100 мкг/мл (доксорубин) и инкубировали при  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  при постоянном перемешивании (150 об/мин). Через заданные интервалы времени (5, 15, 30 мин) цельную кровь центрифугировали ( $1500 \times g$ , 10 мин,  $+20\text{ }^\circ\text{C}$ )

и отбирали 220 мкл плазмы (b-плазма) анализировали с помощью ВЭЖХ, как описано выше (2.5.2) после экстракции доксорубицина (и ВС) смесью АЦН с ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % МК. Аналогичным образом анализировали содержание доксорубицина в контрольной плазме ( $C_{cp}$ ). Коэффициенты распределения ( $K_{Blood/Plasma}$  и  $K_{RBC/Plasma}$ ) рассчитывали согласно уравнениям (21-22):

$$K_{RBC/Plasma} = \frac{1}{H_t} \times \left( \frac{C_{cp}}{C_p} - 1 \right) + 1 \quad (21)$$

$$K_{Blood/Plasma} = \frac{C_{cp}}{C_p} \quad (22)$$

где  $C_{cp}$  – концентрация доксорубицина в контрольной плазме;  $C_p$  – концентрация доксорубицина в b-плазме;  $H_t$  – гематокрит (0,4).

Связывание с эритроцитами доксорубицина (%) после инкубации в цельной крови рассчитывали исходя из полученных значений  $K_{Blood/Plasma}$  по уравнению (23):

$$\text{Связывание с эритроцитами (\%)} = \left( 1 - \frac{1-H_t}{K_{Blood/Plasma}} \right) \times 100\% \quad (23)$$

Все измерения повторяли три раза.

## **2.10. Фармакокинетика наносомальных форм доксорубицина на основе PLGA с различным профилем высвобождения доксорубицина в плазме крови крыс**

Эксперименты *in vivo* при проведении сравнительного фармакокинетического исследования наносомальных форм доксорубицина на основе PLGA с различным профилем высвобождения доксорубицина в плазме крови крыс были выполнены в НИИ Морфологии человека с соблюдением «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (утверждены Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01.04.2016 г. №199н) и рекомендаций «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [179], а также с биоэтическими принципами, установленными Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Страсбург, 1986), а также рекомендациями рабочей группы FELASE (1986, 86/609 / EEC, ISSN 03780 6978).

Все эксперименты выполнены на взрослых самках крыс линии Вистар весом 150–250 г, полученных из питомника лабораторных животных Российской академии медицинских наук (Столбовая, Московская область, Россия). Крыс содержали в клетках по шесть животных в

условиях с естественным световым режимом при температуре 19-21 °С и относительной влажности воздуха 60-75%. На протяжении всего исследования животные получали полнорационный корм и воду *ad libitum*. Фармакокинетическое исследование для двух форм PLGA-Dox НЧ, покрытых полксамером 188, с различным профилем высвобождения доксорубина, полученных на основе PLGA Resomer<sup>®</sup> 502Н при использовании в качестве внешней водной фазы 1 % раствора ПВС в фосфатном буфере с pH 7,4 (PLGA-Dox/7,4) и 6,4 (PLGA-Dox/6,4), проводили в сравнении с раствором гидрохлорида доксорубина (контрольная группа) в воде после однократного болюсного внутривенного введения крысам в дозе 5 мг/кг. Для более глубокого понимания влияния параметров наносомальной формы на фармакокинетику оценивали исследовали ФК профиль как свободного, так и общего (свободного + связанного с НЧ) доксорубина.

Лиофилизированные образцы наночастиц (PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4) ресуспендировали в 1 % водном растворе полксамера 188 для получения суспензии с концентрацией доксорубина 2 мг/мл и вводили внутривенно в хвостовую вену животных (n = 6 для каждой временной точки). В заданные моменты времени (5, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 8, 24 и 48 ч) проводили эвтаназию путем декапитации под наркозом. В качестве агента для ингаляционного наркоза использовали изофлуран (Laboratorios Karizoo, S.A., Испания). Периферическую кровь (5-8 мл от каждой крысы) собирали в пробирки с ЭДТА-К3 и сразу же центрифугировали (1500 × g в течение 10 мин при +18 °С) для отделения плазмы от клеток крови (центрифуга Hettich<sup>®</sup> Universal 320R с бакет-ротором 1628, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Германия). Половину каждого образца плазмы сразу замораживали при -70 °С; вторую половину отбирали для отделения от связанной с наночастицами фракции доксорубина с помощью центрифугирования. Для этого 1,5 мл образца плазмы помещали в пробирки для центрифугирования объемом 10 мл и центрифугировали в течение 30 мин при 48254 × g (+4 °С, Avanti JXN-30). После этого 300 мкл верхнего слоя образца плазмы осторожно переносили в пробирки на 1,5 мл. Чтобы предотвратить деградацию доксорубина, все образцы плазмы (для определения общего и свободного доксорубина) хранили при -70 °С до дальнейшего анализа. Стабильность свободного и связанного с наночастицами доксорубина оценивали во время двойного цикла замораживания-оттаивания в пилотном эксперименте.

Количественное содержание свободного и общего доксорубина в плазме крыс ВЭЖХ определяли методом ВЭЖХ со спектрофлуориметрическим детектированием. Перед проведением анализа доксорубин экстрагировали смесью ДМСО и ацетонитрила (1:1) с добавлением 0,1 % МК. Концентрации доксорубина определяли с использованием калибровочной кривой, построенной с использованием стандарта гидрохлорида доксорубина (EP CRS, 99,0 %, EDQM) с нормализацией по внутреннему стандарту (BC) даунорубина (EP

CRS, 98,5 %, EDQM).

### 2.10.1. Приготовление калибровочных стандартов

Калибровочные стандарты готовили в объединенной плазме крысы с концентрациями доксорубина в диапазоне от 4 до 20000 нг/мл с использованием исходного раствора доксорубина (1 мг/мл), приготовленного, как описано ранее (2.5.2.1). Для получения плазмы крови крыс (для построения калибровочных кривых) цельную кровь отбирали в пробирки с ЭДТА-К3, эритроциты сразу отделяли центрифугированием (1500 x g, +18 °C, 10 мин) при помощи центрифуги Hettich® Universal 320R. Плазму собирали и хранили при -70 °C до дальнейшего анализа. Процедура приготовления исходных калибровочных растворов и 10-кратных калибровочных стандартных растворов доксорубина показана в таблицах 10 и 11.

Таблица 10 – Схема приготовления исходных растворов доксорубина для калибровки в плазме

Конц-я раствора доксорубина, нг/мл	Схема приготовления
200000	100 мкл [р-ра доксорубина 1 мг/мл] + 400 мкл [АЦН:Н <sub>2</sub> O (1:1) + 0,1 % МК]
10000	25 мкл [р-ра доксорубина 200000 нг/мл] + 475 мкл [АЦН:Н <sub>2</sub> O (1:1) + 0,1 % МК]
1000	50 мкл [р-ра доксорубина 10000 нг/мл] + 450 мкл [АЦН:Н <sub>2</sub> O (1:1) + 0,1 % МК]
100	50 мкл [р-ра доксорубина 1000 нг/мл] + 450 мкл [АЦН:Н <sub>2</sub> O (1:1) + 0,1 % МК]

Таблица 11 – Схема приготовления 10-кратных растворов доксорубина для калибровки в плазме

Маркировка образца	Конц-я в плазме, нг/мл	Конц-я 10х р-ров, нг/мл	Исходные растворы, нг/мл	Объем исходных растворов, мкл	Объем добавленного АЦН:Н <sub>2</sub> O (1:1) + 0,1 % МК, мкл
K1	4	40	100	80	120
K2	10	100	100	-	-
K3	20	200	1000	40	160
K4	40	400	1000	80	120
K5	100	1000	1000	-	-
K6	200	2000	10000	40	160
K7	400	4000	10000	80	120
K8	700	7000	10000	140	60
K9	1000	10000	10000	-	-
K10	4000	40000	200000	40	160
K11	10000	100000	200000	100	100
K12	20000	200000	200000	-	-

Непосредственно перед проведением пробоподготовки к анализу готовили рабочий раствор ВС (даунорубицин, 2000 нг/мл) путем добавления 475 мкл смеси АЦН:вода (1:1) с добавлением 0,1 % МК к 25 мкл раствора ВС (40 мкг/мл), приготовленного как описано выше (2.5.2.1). Калибровочные растворы были приготовлены 3 раза из отдельных аликвот исходного раствора для оценки точности и прецизионности.

#### 2.10.2. Методика подготовки образцов, используемая для определения концентрации доксорубина в плазме крыс для калибровки

Плазму крыс размораживали при комнатной температуре, 200 мкл переносили в пробирки на 1,5 мл, прибавляли 20 мкл соответствующего 10-кратного калибровочного стандартного раствора доксорубина, за исключением бланк-раствора (без аналита), осторожно перемешивали в течение 2 мин при температуре +4°C с помощью ThermoMixer C (Eppendorf AG, Германия). В случае бланк-раствора добавляли 20 мкл смеси АЦН:вода (1:1) + 0,1 % МК. Далее 20 мкл рабочего раствора ВС (даунорубицин, 2000 нг/мл) добавляли во все образцы, кроме холостых; в случае холостых проб добавляли 20 мкл смеси АЦН:вода (1:1) + 0,1 %. Образцы экстрагировали 300 мкл охлажденного (-20 °C) АЦН, содержащего 0,1 % МК, и перемешивали при 1200 об/мин в течение 2 мин. Затем добавляли 300 мкл ДМСО и смесь перемешивали при 1200 об/мин еще в течение 8 мин, далее образцы центрифугировали в течение 30 минут при 4000 об/мин при +4 °C с использованием центрифуги Eppendorf 5804R. Аликвоту 300 мкл супернатанта отбирали для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ.

#### 2.10.3. Методика подготовки образцов, используемая для определения свободного и общего доксорубина в плазме крыс

Образцы плазмы, содержащие свободный или общий доксорубин (свободный + связанный с НЧ), размораживали при комнатной температуре и 220 мкл переносили в пробирки на 1,5 мл, затем добавляли 20 мкл раствора ВС (даунорубицин, 2000 нг/мл), и перемешивали (1200 об/мин) при температуре +4 °C с помощью ThermoMixer C в течение 2 минут. Доксорубин экстрагировали, как описано выше.

#### 2.10.4. Параметры ВЭЖХ анализа

Анализ выполняли с использованием системы ВЭЖХ (Agilent 1200), оснащенной

детектором с диодной матрицей и флуоресцентным детектором, а также колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 (80Å, 150 x 3 мм, 5,0 мкм, Agilent Technologies, США). ПФ состояла из смеси буфера (2,88 г/л додецилсульфата натрия и 2,25 г/л ортофосфорной кислоты в воде) и АЦН (54:46, об./об.); скорость ПФ составляла 0,7 мл/мин; температура колонки +40 °С. Для анализа образец органической фазы (300 мкл), полученный, как описано выше, разбавляли 300 мкл буферного раствора (2,88 г/л додецилсульфата натрия и 2,25 г/л ортофосфорной кислоты в воде). Объем инжектируемой пробы составлял 5-60 мкл. Для расчета концентраций использовали результаты, полученные при  $\lambda_{ex}=480$  нм и  $\lambda_{em}=550$  нм. Кроме того, для определения времени удерживания пиков доксорубина и даунорубина (BC) использовали детектирование при  $\lambda_{ex}=254$  нм и  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=230/550$  нм.

Концентрации доксорубина в плазме рассчитывали по двум калибровочным кривым с использованием химического стандарта (CRS) доксорубина (EP CRS, 99,0%, EDQM) с нормализацией по внутреннему стандарту. Первая калибровочная кривая была построена в диапазоне концентраций от 4 до 400 нг/мл,  $C_{\text{Доксорубин}} [\text{нг / мл}]$  ( $R^2=0,9999$ ):

$$\frac{S_{\text{Доксорубин}}}{S_{\text{BC}}} = 0,0047 \times C_{\text{Доксорубин}} + 0,0070 \quad (24)$$

Вторая кривая была построена в диапазоне концентраций от 400 до 20 000 нг/мл,  $C_{\text{Доксорубин}} [\text{нг / мл}]$  ( $R^2=0,9999$ ):

$$\frac{S_{\text{Доксорубин}}}{S_{\text{BC}}} = 0,0043 \times C_{\text{Доксорубин}} + 0,4128 \quad (25)$$

Предел количественного определения (LOQ) составлял 0,007 мкг/мл. В плазме коэффициент вариации (RSD, %) точности был менее 20%, а степень экстракции доксорубина и BC более 95%.

#### 2.10.5. Анализ фармакокинетических данных

Первоначально основные фармакокинетические параметры для свободного и общего (свободный + связанный с НЧ) доксорубина были определены с использованием Monolix Suite 2019R1 (Lixoft, Франция) внемодельным методом. Усредненные профили изменения концентрации доксорубина, построенные по среднеарифметическим значениям его концентрации в плазме крови крыс, во времени (t) характеризовали значениями площади под кривой "концентрация-время" в пределах от нуля до момента отбора последней пробы крови

(AUC), а также площади под фармакокинетической кривой в пределах от нуля до 1 ч после введения ( $AUC_{0 \rightarrow 1h}$ ). Кроме того, рассчитывали пиковую концентрацию в плазме  $C_{max}$ , клиренс (Cl), а также кажущийся объем распределения в стационарных условиях  $V$ .

Далее проводили анализ фармакокинетических данных с использованием новой физиологически обоснованной биофармацевтической модели PBNB (*англ.* Physiologically-based nanoparticle biopharmaceutics model), разработанной и адаптированной для данного исследования группой проф. Маттиаса Г. Вакера (Национальный университет Сингапура). Модель PBNB сочетает в себе обычное компартментальное моделирование с физиологическими диапазонами параметров для оценки свободной и связанной с носителем фракции ЛВ [172]. По сравнению с предыдущими исследованиями [172] в адаптированной модели инфузия нулевого порядка была заменена болюсной инъекцией лекарственной формы в «отсек носителя» (*англ.* carrier compartment), что соответствует фармакокинетическому поведению наноразмерной формы при внутривенном введении крысам. Анализ проводился с помощью Monolix Suite 2019R1 (Lixoft, Франция).

Многокомпарментная модель была написана на языке Mixtran и выполнена с использованием программного обеспечения Monolix. Вкратце, модель состоит из трех основных отсеков (компарментов). «Отсек носителя» представляет собой связанную с носителем фракцию ЛВ, которая из-за пониженной подвижности по сравнению со свободным ЛВ характеризуется меньшим объемом распределения ( $V_{DC}$ ). Предполагалось, что  $V_{DC}$  соответствует объему плазмы крови крыс [172; 180]. Накопление носителя (*англ.* accumulation), происходящее из-за взаимодействий системы доставки ЛВ с клетками или тканями, представлено процессом элиминации первого порядка из «компармента носителя». Этот процесс выведения определяется периодом полувыведения носителя ( $t_{1/2}$ ) и во многом отвечает за величину накопленной фракции ЛВ ( $m_{accum}$ ). Второй путь распределения ведет из «отсека носителя» в отсек, представляющий собой высвобожденную фракцию ЛВ. Предполагался процесс высвобождения, соответствующий модели 3RPT [172] (2.5.3).

Распределение фракции свободного (не связанного с носителем) ЛВ довольно точно описывается традиционной двухкамерной моделью, которая характеризуется наличием центрального и периферического отсека (компармента) и тремя константами скоростей: константой скорости элиминации ЛВ из центрального отсека (кинетика первого порядка,  $k_F$ ) и константами скоростей распределения ЛВ между центральным и периферическим отсеком ( $k_{12}$  и  $k_{21}$ ). Иллюстрация данной модели представлена на рисунке 8. Все параметры были ограничены заранее определенными диапазонами, как показано в таблице 12. Период полувыведения носителя был задан в пределах 1 ч. Параметры распределения и выведения ( $k_F$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ), а также объем распределения свободного ЛВ ( $V_{DF}$ ) были установлены на основании

полученных фармакокинетических параметров для контрольной группы (раствор доксорубина гидрохлорида в воде). Для оценки распределения свободного доксорубина в контрольной группе применяли традиционную двухкомпонентную модель, параметры рассчитывали с использованием программного обеспечения PKanalix (Lixoft, Франция).



Рисунок 8 – Иллюстрация модели PBNB, используемой для анализа фармакокинетических данных. Модель состоит из трех основных отсеков, включая связанную с носителем (серый цвет) и высвобожденную фракцию лекарственного вещества (зеленый цвет), а также один периферический отсек (синий цвет), куда происходит распределение свободной фракции лекарственного вещества

Таблица 12 – Диапазоны параметров, заданные для анализа данных с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели (PBNB)<sup>#</sup>

Параметр	Диапазон значений параметра	Источник
$V_{DC}$ , л	$8,325 \pm 4,03$ ( $\omega$ : 0,5)	[180]
$t_{1/2}^I$ , ч	$0,5 \pm 0,71$ ( $\omega$ : 0,5)	[181; 182]
$t_{1/2}^{II}$ , ч	$0,364 \pm 0,017$ h ( $\omega$ : 0,5)	-
$k_F$ , ч <sup>-1</sup>	$1,074 \pm 0,46$ ( $\omega$ : 0,5)	-
$k_{12}$ , ч <sup>-1</sup>	$13,77 \pm 2,62$ ( $\omega$ : 0,5)	-
$k_{21}$ , ч <sup>-1</sup>	$0,68 \pm 0,21$ ( $\omega$ : 0,5)	-
$V_{DF}$ , мл	$787,69 \pm 293,13$ ( $\omega$ : 0,5)	-

<sup>#</sup> Было проведено два варианта моделирования с разными диапазонами значений периода полувыведения носителя ( $t_{1/2}$ ) (I и II). Второй диапазон для периода полувыведения носителя (II), а также фармакокинетические параметры свободного доксорубина были получены путем фармакокинетического анализа, а не из литературных источников

Кроме того, высвобождение лекарственного средства *in vivo* и нацеливающую способность (*англ.* targeting capability) рассчитывали, как было описано ранее в [172]. Вкратце, кумулятивное высвобождение ЛВ *in vivo* (%) определяется как доля дозы ЛВ, высвобождаемой из носителя, в то время как нацеливающая способность ( $F_{target}$ , %) представляет собой долю дозы (D), которая накапливается до того, как лекарственное вещество высвобождается из носителя (26):

$$F_{target} = \frac{m_{accum}}{D} \times 100\% \quad (26)$$

### 2.11. Статистический анализ данных

Статистический анализ данных был выполнен с помощью программного обеспечения Statsoft Statistica 8.1 (StatSoft Inc., США) с использованием t-критерия Стьюдента; Уровень статистической значимости был установлен на уровне  $p < 0,05$ . Определение размера частиц, распределения по размерам и  $\zeta$ -потенциала проводили в четырех повторностях, тогда как все измерения *in vitro* проводили в трех повторностях. При оптимизации метода определения степени доксорубина в НЧ проводили шесть параллельных измерений. Для экспериментов на животных всех мышей помещали в клетки и делили на группы (по 6 животных на временную точку).

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений разработки систем направленной доставки лекарств является создание НЧ на основе биосовместимых и биodeградируемых полимеров, таких как сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLA/PLGA) [1]. В ранее проведенных исследованиях наносомальная форма антрациклинового антибиотика доксорубицина на основе НЧ PLGA, модифицированных полоксамером 188, проявила высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс [3; 7]. В то же время влияние физико-химических параметров наносомальной формы на профиль высвобождения доксорубицина и фармакокинетику *in vivo* остается недостаточно изученным.

В рамках настоящей работы проведено комплексное исследование, позволяющее выявить факторы, обеспечивающие возможность получения наночастиц на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот с заранее заданным профилем высвобождения из них доксорубицина (PLGA-Dox). При этом были разработаны методы получения PLGA-Dox НЧ с различным профилем высвобождения доксорубицина *in vitro*. Для определения параметров полученных лекарственных форм были разработаны и оптимизированы методы физико-химического анализа, включая методы определения размера и распределения частиц по размерам,  $\zeta$ -потенциала поверхности НЧ, морфологии НЧ, методы определения общего содержания полимера и доксорубицина в НЧ, степени включения доксорубицина в НЧ, содержания влаги в образцах НЧ, содержания остаточного ПВС, в соответствии с международными требованиями для лекарственных средств, содержащих наноматериалы (FDA, EMA) и одобренными каскадными протоколами анализа нанотехнологичных ЛС (US-NCL, EU-NCL). Кроме того, были разработаны и оптимизированы методы изучения и математического описания кинетики высвобождения доксорубицина из НЧ *in vitro* в модельные среды и плазму и профиля гидролитической деградации НЧ, методы оценки сорбции полоксамера 188 на поверхности НЧ, а также методы оценки параметров распределения PLGA-Dox НЧ между плазмой и эритроцитами крови человека. Для оценки влияния физико-химических параметров PLGA-Dox НЧ и профиля высвобождения *in vitro* на фармакокинетику *in vivo* было проведено сравнительное исследование фармакокинетики наносомальных форм доксорубицина с различным профилем высвобождения доксорубицина в сравнении с субстанцией доксорубицина гидрохлорида при однократном внутривенном введении крысам.

### 3.1. Получение наночастиц PLGA, нагруженных доксорубицином, и оптимизация методов оценки их физико-химических параметров

В рамках настоящей работы методом «двойных эмульсий» путем варьирования различных технологических параметров, таких как pH внешней водной фазы (1% ПВС в фосфатно-солевом буфере, 7,4/6,4), состав полимерной композиции (молекулярный вес полимера, наличие или отсутствие концевых карбоксильных групп PLGA), добавление противоиона (АОТ) для образования ионной пары доксорубицин-АОТ гидрофобной природы, были получены нагруженные доксорубицином наночастицы на основе PLGA (PLGA-Dox) с различными свойствами. Процесс получения НЧ представлен на рисунке 9.

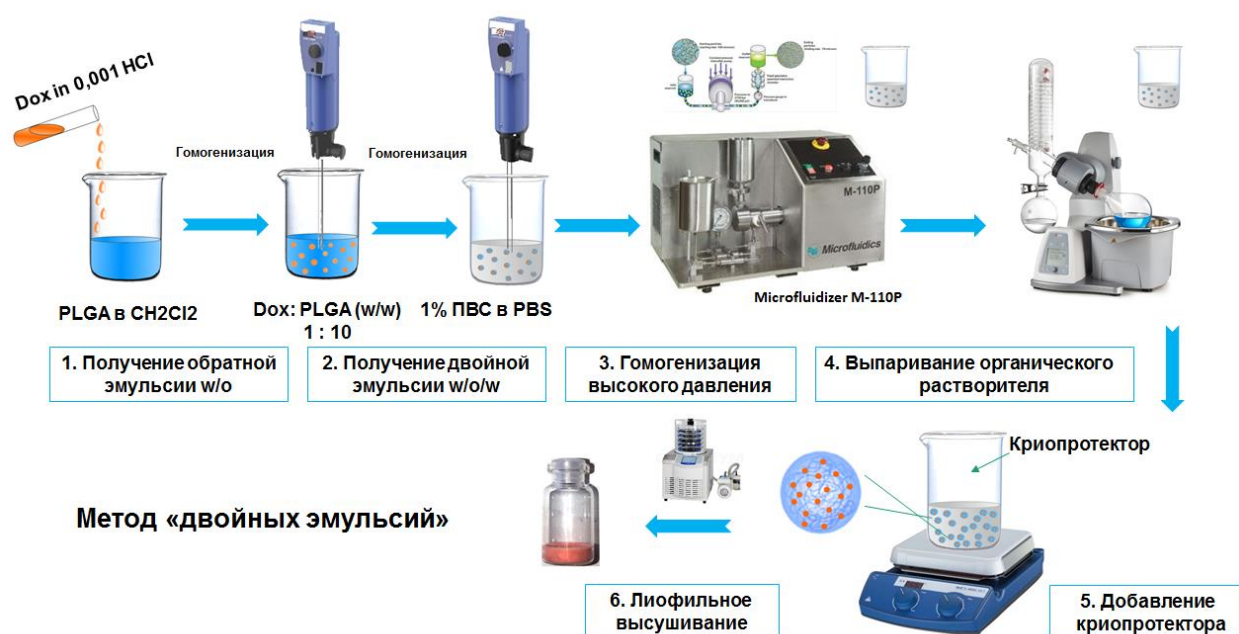


Рисунок 9 – Получение PLGA-Dox НЧ методом «двойных эмульсий»

Для того, чтобы определить ключевые физико-химические параметры полученных наноразмерных форм и впоследствии оценивать влияние этих параметров на профиль высвобождения доксорубицина *in vitro* и фармакокинетику *in vivo*, необходимо было первоначально разработать и оптимизировать методы анализа этих параметров. Разработка надежных методов анализа наноразмерных лекарственных форм является важным шагом на пути внедрения этих форм в клиническую практику. Помимо надлежащего контроля качества надежные методы анализа позволяют соотнести физико-химические свойства НЧ с их биологическими эффектами и таким образом повысить качество доклинических исследований [183].

Наряду с классическими методами оценки показателей качества, используемыми для традиционных лекарственных форм, для определения безопасности и эффективности нанопрепаратов требуется исследование многих дополнительных «особых» параметров. К «особым» свойствам наноразмерных лекарственных форм, которые нужно изучать и контролировать в процессе фармацевтической разработки, относятся: физико-химические параметры, такие как размер, стабильность, степень агрегации НЧ, заряд и морфология поверхности НЧ, морфология ядра (аморфность, степень кристалличности), количественный состав НЧ, в том числе содержание активных компонентов, эффективность функционализации поверхности, профиль и скорость высвобождения ЛВ из НЧ в модельных средах и плазме *in vitro*, свойства, используемые для диагностики (магнитные, флуоресцентные и т.д.); и биологические, такие как связывание с компонентами крови (белки плазмы, эритроциты, лейкоциты), гемолитическая активность и активация тромбоцитов, фармакокинетика и биораспределение свободного и связанного с носителем ЛВ, биологическая активность, токсическое действие и риск развития побочных эффектов, связанных с носителем [184; 185].

Оптимизацию методов для оценки физико-химических параметров разработанных наноразмерных форм проводили с использованием репрезентативных серий двух типов PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA Resomer® 502Н с концевыми кислотными группами и характеристической вязкостью 0,2 дл/г, Mw 10-12 кДа (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) при рН внешней водной фазы 7,4 (PLGA-Dox/7,4) и 6,4 (PLGA-Dox/6,4). Усредненные физико-химические параметры данных и других наноразмерных форм, полученные путем анализа с использованием оптимизированных методик, приведены в следующих разделах.

### 3.1.1. Оптимизация методов оценки размера, распределения по размерам и $\zeta$ -потенциала поверхности PLGA-Dox наночастиц

Как было отмечено ранее, размер НЧ и распределение НЧ по размерам, а также агрегационная стабильность НЧ в биологических средах являются критическими параметрами качества наноразмерных лекарственных форм в рамках проведения их доклинических исследований [184; 186], поскольку данные параметры влияют на абсорбцию, биораспределение и выведение из организма, и в конечном итоге, на величину фармакологического эффекта и побочных эффектов, связанных с носителем [183]. Важно отметить, что размер частиц может изменяться при взаимодействии лекарственной формы с компонентами биологических сред, в частности, в результате адсорбции белков плазмы на поверхности частиц, при этом может наблюдаться как укрупнение частиц или выпадение осадка, так и увеличение стабильности частиц в суспензии.

В связи с этим, размер частиц, полидисперсность и стабильность НЧ необходимо изучать в простых и биологических средах на всех стадиях фармацевтической разработки, а также при рутинном анализе на производстве готового продукта. Согласно инструкциям регулирующих органов, включая ЕМА [187-189] и FDA [158], данные параметры должны быть изучены не только непосредственно после синтеза наноразмерных форм в лабораторных условиях, но также контролироваться в процессе долгосрочного хранения форм, при оценке воспроизводимости производственного процесса, при анализе конечного продукта; кроме того, рекомендуется анализировать изменение размера частиц при контакте с физиологической средой (взаимодействие с белками плазмы).

Для анализа размера и распределения частиц по размерам могут быть использованы различные методы, включая электронную (сканирующую и просвечивающую) и атомно-силовую микроскопию, методы динамического лазерного светорассеяния (*англ.* Dynamic Light Scattering, DLS) и лазерной дифракции (*англ.* Laser Diffraction), фракционирование наночастиц в потоке под действием поля внешних сил (*англ.* Field-Flow Fractionation, FFF), седиментационные методы – аналитическое ультрацентрифугирование, импульсное перестраиваемое резистивное зондирование (*англ.* Tunable Resistive Pulse Sensor, TRPS), анализ траектории наночастиц (*англ.* Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) [190]. Микроскопия является одним из наиболее точных методов, но при этом он длительный, требует специальной пробоподготовки образца, при этом образец должен быть устойчив к воздействию электронного луча и глубокого вакуума (в случае трансмиссионной электронной микроскопии) т.д. Кроме того, в случае сканирующей электронной микроскопии органические непроводящие образцы должны быть покрыты золотом, платиной или углеродом, что в случае очень маленьких НЧ, вызывает неопределенность в отношении эффективной толщины покрытия и, следовательно, в отношении реального размера частиц.

Метод динамического лазерного светорассеяния (далее, DLS) является одним из наиболее распространенных и широко используемых методов изучения размера и распределения частиц по размерам. Этот метод основан на анализе временных флуктуаций интенсивности рассеянного света коллоидной системой для оценки коэффициента диффузии частиц, который зависит от размеров частиц и вязкости среды. При этом величина гидродинамического радиуса частиц может сильно зависеть от параметров среды (вязкость, pH, ионная сила, присутствие электролитов) и разбавления образца. Кроме того, неоднородность образцов может исказить результаты: более крупных частицы рассеивают свет намного сильнее, чем более мелкие частицы. Таким образом, хотя метод DLS и является простым, быстрым и недорогим, однако относится к методам низкого разрешения и не подходит для анализа полидисперсных образцов [191], поэтому для более полной характеристики наночастиц необходимо использовать

дополнительно методы высокого разрешения [192].

В рамках настоящей работы было проведено исследование влияния параметров измерения: тип анализатора, состава дисперсионной среды, разведение НЧ на величину измеряемого гидродинамического радиуса, как описано в разделе 2.4.1. Оптимизацию метода проводили с использованием образцов PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ. Первоначально, размеры и распределение для PLGA-Dox/7,4 НЧ по размерам измеряли с использованием двух анализаторов (Zetasizer Nano ZS и NanoBrook Omni) в воде в трех вариантах разведения суспензии НЧ (0,1, 0,2 и 0,4 мг/мл по PLGA), затем в различных средах при разведении суспензии до 0,2 мг/мл по PLGA; таблицы 13 и 14.

Таблица 13 – Размеры, PDI и распределение НЧ PLGA-Dox/7,4 по размерам (по объему и интенсивности), определенные методом DLS с использованием NanoBrook Omni; n=3

Среда	PLGA, мкг/мл	Zaved, нм	Count rate	PDI	Int, нм	Vol, нм
Вода MilliQ	0,1	100,0 ± 1,0	562,1	0,157 ± 0,022	114,2 ± 5,9	76,2 ± 20,6
	0,2	101,3 ± 2,3	398,8	0,145 ± 0,015	106,8 ± 4,6	89,6 ± 12,4
	0,4	101,1 ± 0,6	418,2	0,144 ± 0,009	114,7 ± 6,4	73,6 ± 28,0
1% р-р Полоксамера 188	0,2	108,8 ± 0,7	421,3	0,173 ± 0,018	157,4 ± 34,1	209,2 ± 145,0
0,15 М PBS		101,2 ± 0,9	411,1	0,162 ± 0,032	137,6 ± 28,3	167,9 ± 140,8
10 мМ PBS		102,0 ± 1,1	468,7	0,153 ± 0,035	134,3 ± 23,8	147,3 ± 47,1
0,16 М NaCl		105,3 ± 0,2	488,7	0,152 ± 0,025	112,3 ± 9,4	87,2 ± 10,2
10 мМ NaCl		101,5 ± 0,5	444,8	0,145 ± 0,011	124,8 ± 20,0	101,0 ± 49,9
4% HAS		80,0 ± 2,7	481,4	0,283 ± 0,046	116,8 ± 33,9	2,3 ± 0,4

Таблица 14 – Размеры, PDI и распределение НЧ PLGA-Dox/7,4 по размерам (по объему и интенсивности), определенные методом DLS с использованием Zetasizer Nano ZS; n=3

Среда	PLGA, мкг/мл	Zaved, нм	Count rate	PDI	Int, нм	Vol, нм
Вода MilliQ	0,1	101,0 ± 0,4	448,1	0,159 ± 0,005	113,0 ± 2,1	86,7 ± 1,0
	0,2	101,9 ± 0,6	262,4	0,163 ± 0,008	113,1 ± 3,1	87,4 ± 1,2
	0,4	102,5 ± 0,4	421,2	0,149 ± 0,012	113,1 ± 2,1	89,2 ± 0,8
1% р-р Полоксамера 188	0,2	111,8 ± 1,4	243,6	0,197 ± 0,008	126,6 ± 4,1	97,3 ± 2,8
0,15 М PBS		104,9 ± 0,5	249,1	0,148 ± 0,009	117,5 ± 4,1	92,1 ± 1,2
10 мМ PBS		111,3 ± 1,7	295,5	0,234 ± 0,013	119,6 ± 2,1	90,2 ± 1,1
0,16 М NaCl		105,4 ± 0,8	230,5	0,143 ± 0,018	117,9 ± 4,6	93,2 ± 2,1
10 мМ NaCl		102,7 ± 0,7	212,0	0,149 ± 0,006	112,3 ± 3,1	89,3 ± 2,1
4% HAS		70,16 ± 4,3	262,5	0,765 ± 0,080	111,9 ± 2,3	2,79 ± 0,1

Таким образом, было выявлено, что при использовании в качестве дисперсионной среды воды и в диапазоне разведений НЧ 0,1-0,4 мг/мл по полимеру не выявлено различий в определяемых физико-химических параметрах НЧ (рисунок 10), что позволяет анализировать размер при разведении суспензии НЧ примерно в 50 раз (не требуется высокая точность), в дальнейшем измерения проводили при концентрации 0,2 мг/мл по PLGA. Размеры НЧ,

полученные с использованием двух типов анализаторов, были близки; тем не менее, значения, полученные с использованием Zetasizer Nano ZS, были немного выше при измерении размеров в фосфатно-солевом буфере и ниже в 4 % альбумине.

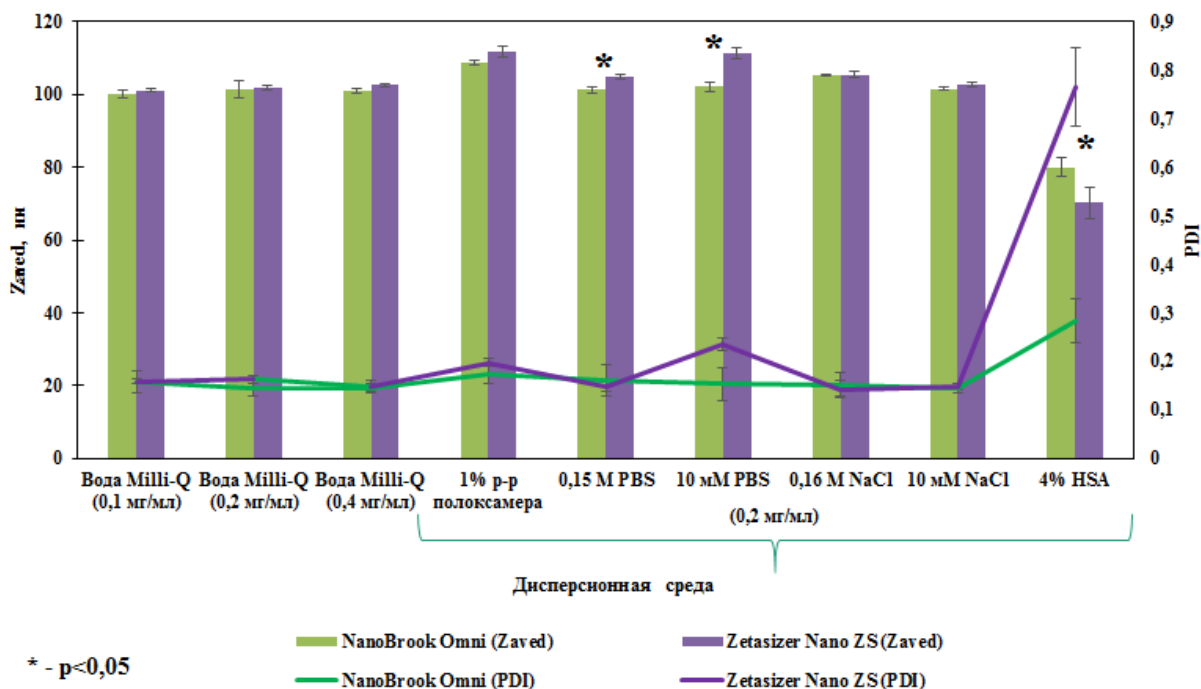


Рисунок 10 – Влияние параметров измерения на средний размер (Zaved) и индекс полидисперсности PLGA-Dox/7,4 НЧ

Что касается влияния дисперсионной среды на величину среднего размера НЧ, наблюдалось увеличение размера и PDI при измерении в 1 % растворе полоксамера 188. Полоксамер 188 вызывал увеличение размеров НЧ, вероятно, вследствие сорбции на поверхности НЧ; результаты согласуются с данными других авторов [193]. При измерении размера НЧ в среде 4% сывороточного альбумина появление дополнительных пиков, относящихся к размеру молекул альбумина, приводили к снижению среднего (Zaved) размера НЧ, тем не менее, размер фракции (по объему), относящейся к НЧ, в присутствии альбумина не увеличивался.

Анализаторы Zetasizer Nano ZS и NanoBrook Omni также позволяют определять потенциал поверхности НЧ ( $\zeta$ -потенциал) методом микроэлектрофореза. При этом, если размер НЧ в воде не зависел от концентрации НЧ (в диапазоне 0,1-0,4 мг/мл), то значения  $\zeta$ -потенциала при разбавлении существенно изменялись: при увеличении разбавления (от 0,1 до 5 мг/мл) увеличивались абсолютные значения  $\zeta$ -потенциала (таблица 15). Можно отметить, что в растворе 1 % полоксамера 188 НЧ  $\zeta$ -потенциал приобретал менее отрицательные значения, что

также может косвенно свидетельствовать о сорбции ПАВ на поверхности НЧ. Измерение  $\zeta$ -потенциала в средах с высокой ионной силой не рекомендуется, поэтому использование фосфатного буфера и растворов натрия хлорида не проводили.

Таблица 15 – Влияние разведения на величину  $\zeta$ -потенциала поверхности PLGA-Dox/7,4 НЧ

Анализатор	Концентрация НЧ (PLGA), мг/мл	$\zeta$ -потенциал	
		Вода Milli-Q	1% раствор полоксамера 188
Zetasizer Nano ZS	5	-0,919 ± 0,257	-0,945 ± 0,094
	1	-5,25 ± 0,26	-4,90 ± 0,396
	0,5	-9,15 ± 0,46	-8,36 ± 0,86
	0,2	-15,4 ± 0,7	-9,31 ± 2,46
	0,1	-19,6 ± 0,4	-13,3 ± 1,18

Что касается измерения физико-химических параметров PLGA-Dox/6,4, было отмечено, что после лиофилизации в присутствии маннита в концентрации 5% в суспензии PLGA-Dox/6,4 появляются микроагрегаты (3-5 мкм), фракция которых составляет от 3 до 6 %. При этом формирование агрегатов не было отмечено для PLGA-Dox/7,4 НЧ. Кроме того, агрегаты образуются в суспензии повторно после фильтрования суспензии через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Вероятно, агрегация происходит вследствие того, что при получении НЧ в кислом pH большая доксорубицина оказалась сорбированной на поверхности НЧ, а не включенной в матрицу PLGA, присутствие доксорубицина на поверхности НЧ приводит к дестабилизации системы и агрегации НЧ. Присутствие микронной фракции искажает результат определения среднего размера методом DLS, при этом результаты, полученные с использованием анализатора NanoBrook Omni (мультимодальное распределение) представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Размеры, PDI и распределение НЧ PLGA-Dox/6,4 по размерам (по объему и интенсивности), определенные методом DLS с использованием NanoBrook Omni; n=3

Среда	PLGA, мг/мл	Zaved, нм	Count rate	PDI	Int, нм	Vol, нм
Вода MilliQ	0,1	116,2 ± 2,6	477,8	0,217 ± 0,014	178,3 ± 14,4	414,3 ± 216,7
	0,2	116,5 ± 0,3	477,3	0,213 ± 0,008	140,7 ± 9,3	86,2 ± 14,3
	0,4	123,5 ± 1,1	428	0,226 ± 0,013	187,9 ± 33,4	424,7 ± 286,9
1% р-р Полоксамера 188	0,2	128,2 ± 0,8	486,2	0,245 ± 0,009	182,6 ± 34,1	213,3 ± 227,7
0,15 М PBS		119,8 ± 1,6	439,2	0,221 ± 0,022	156,7 ± 17,3	140,6 ± 49,5
10 мМ PBS		121,4 ± 2,7	498,2	0,211 ± 0,025	244,4 ± 129,2	217,5 ± 79,5
0,16 М NaCl		123,7 ± 4,0	548,8	0,198 ± 0,044	195,7 ± 91,4	271,9 ± 300,0
10 мМ NaCl		118,0 ± 1,4	522,4	0,226 ± 0,022	175,8 ± 28,5	163,6 ± 36,4
4% HAS		91,2 ± 2,5	530,7	0,319 ± 0,016	158,7 ± 21,2	2,2 ± 0,1

В связи с этим дополнительно было проведено исследование влияния типа (маннит, трегалоза, лактоза, сахароза) и содержания (2,5, 5 и 10%) криопротектора на размер, PDI и распределение по размерам восстановленной суспензии НЧ (рисунок 11). Было отмечено, что во всех случаях, кроме использования маннита в концентрации 5 и 10 % (масс.), форма лиофилизата была неудовлетворительной (трещины, слоистость, блестящая поверхность), также данные образцы после лиофилизации плохо ресуспендировались: образовывался осадок, который не удавалось устранить даже при воздействии ультразвука. Таким образом, повышение концентрации маннита до 10 % позволило сохранить исходные физико-химические характеристики PLGA-Dox НЧ (рисунок 12). Однако, поскольку маннитол сам по себе является фармакологически активным веществом, его содержание в ЛФ должно быть сведено к минимуму. Эффекты, связанные с повышением проницаемости ГЭБ, достигаются при непосредственном введении маннита в артериальное кровообращение мозга с высокой скоростью: интраартериальные инфузии гиперосмотических растворов маннита используются для лечения отека головного мозга и для улучшения доставки химиотерапевтических агентов в мозг [194]. При этом для человека эффективные дозы маннита при интраартериальном введении (20-25% растворы) составляют от 0,5 до 1,5 г/кг [195; 196]. В литературе сообщалось о различных дозах для крыс: от 0,77 г в пересчете на животное [197] до 10 г в пересчете на животное [198]. Известно также, что маннитол снижает внутричерепное давление при внутривенном введении. В исследовании на крысах было показано, что внутривенное введение маннита в дозе 500 мг/кг не увеличивает проницаемость ГЭБ для больших (комплекс альбумина с синим Эванса) и малых (NaF) молекул [199]. В нашем случае, соотношение доксорубицин-маннит в лекарственной форме составляло  $\approx 1:45,5$  (масс.) и  $\approx 1:91$  (масс.) при использовании маннита в концентрации 5 и 10% в лекарственной форме, соответственно. Фармакокинетическое исследование наноразмерных форм доксорубицина планировали проводить при однократном внутривенном введении суспензии НЧ в дозе 5 мг/кг (по доксорубицину): при использовании 5% маннита животные получали бы 5 мг/кг доксорубицина и  $\approx 227$  мг/кг маннита в виде однократной дозы; а при использовании 10 % маннита –  $\approx 454$  мг/кг маннита. Чтобы избежать влияния высокой концентрации маннита на биораспределение лекарственных форм, при лиофилизации всех полученных образцов НЧ далее использовали 5% (масс.) маннит.

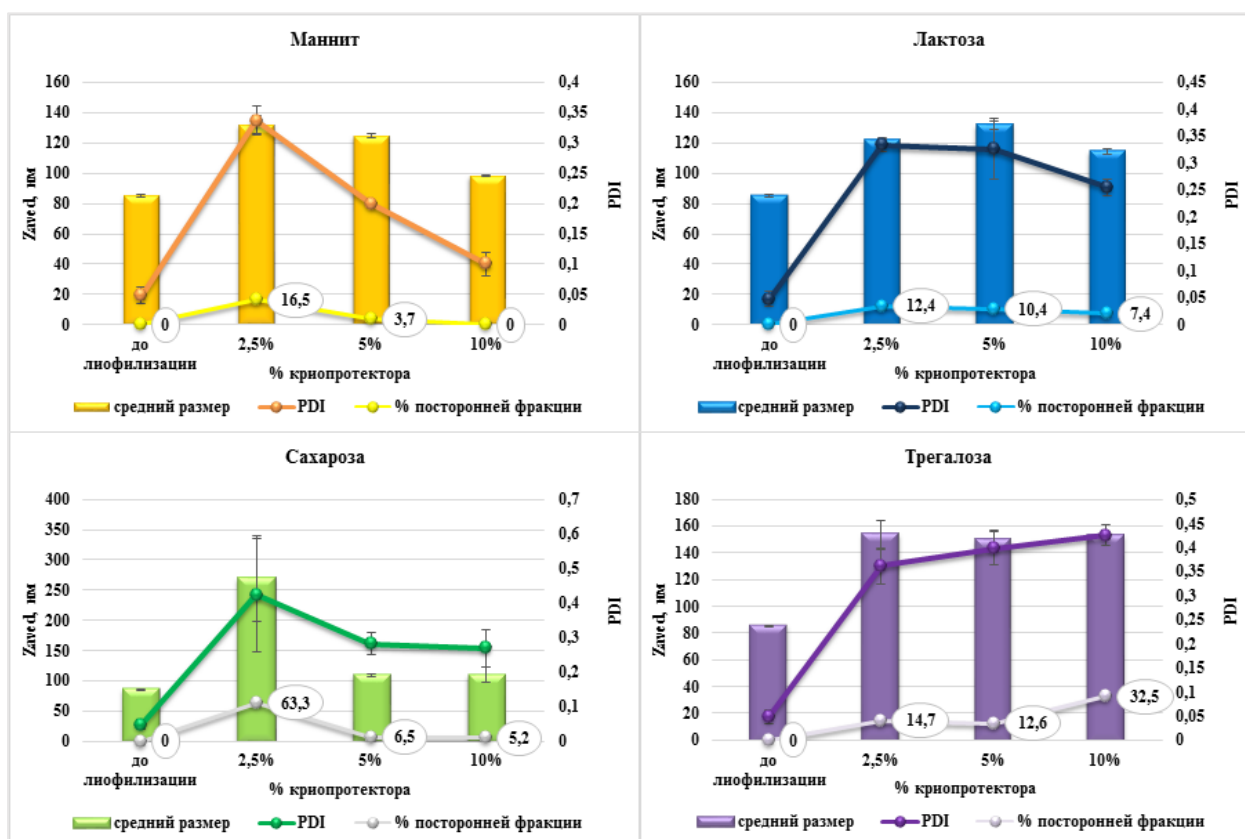


Рисунок 11 – Влияние типа и концентрации криопротектора на размер, PDI и содержание микроагрегатов в суспензии PLGA-Dox/6,4 НЧ

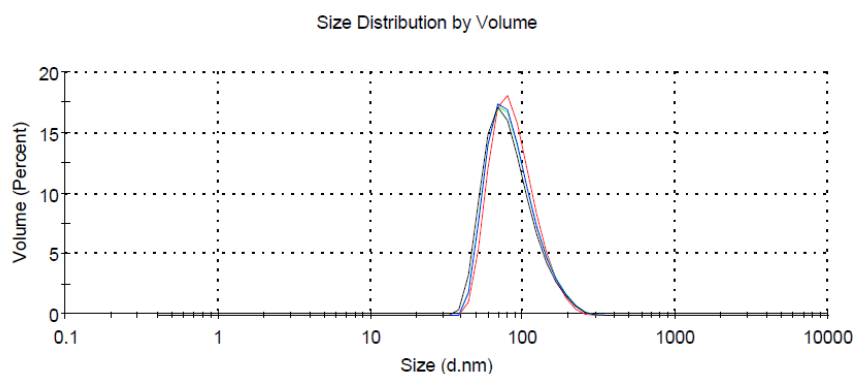


Рисунок 12 – Распределение по размерам образца PLGA-Dox/6,4 после лиофилизации с использованием маннита в качестве криопротектора (10 % масс.)

В дальнейшем физико-химические параметры НЧ в настоящем исследовании были измерены в воде, разведение – 0,2 мг/мл по PLGA, анализатор - Zetasizer Nano ZS. Усредненные физико-химические параметры PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 для аналогичных трех серий, определенные в данных условиях, приведены в таблице 17.

Таблица 17 – Усредненные физико-химические параметры PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4, определенные методом DLS с использованием Zetasizer Nano ZS; среда – вода Milli-Q; разведение до 0,2 мг/мл по полимеру; n=3

Образец НЧ	Размер, нм	PDI	ζ-потенциал, Мв
<b>PLGA-Dox/7,4</b>	105 ± 12	0,144 ± 0,001	-10,46 ± 1,33
<b>PLGA-Dox /6,4</b>	137 ± 7	0,301 ± 0,069	-6,90 ± 2,98

Размеры НЧ, определенные с помощью ПЭМ, были значительно меньше и составляли в среднем 50±16 нм (рисунок 13). Средний размер НЧ, измеренный методом DLS, представляет собой гидродинамический диаметр наночастицы, при этом он теоретически должен превышать размер, определенный методом ПЭМ, так как в первом случае учитывается размер гидратной оболочки вокруг НЧ [200]. Поскольку полученные наночастицы PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 имеют отрицательный дзета-потенциал поверхности, величина гидратной оболочки вносит существенный вклад в величину среднего размера, определенного методом DLS.

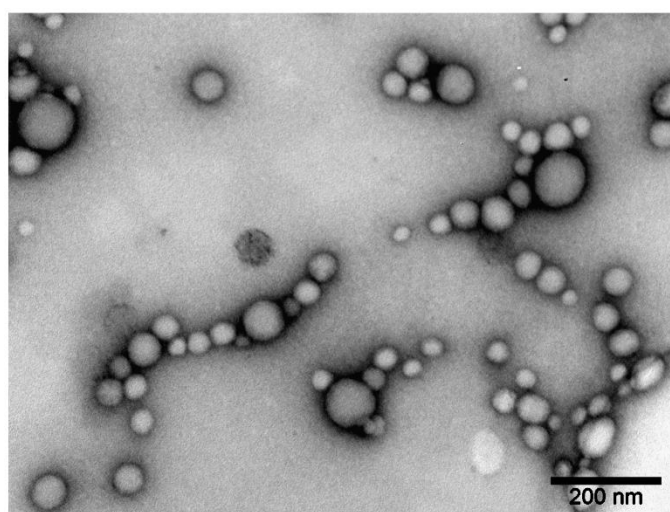


Рисунок 13 – Электронная микрофотография PLGA-Dox/7,4 наночастиц (просвечивающий электронный микроскоп JEOL JEM-1400, Япония); контрастирующий агент 1 % раствор уранила ацетата [201]

### 3.1.2. Оптимизация методов оценки общего содержания доксорубина и его примесей

Общее содержание доксорубина в образцах PLGA-Dox НЧ оценивали с использованием метода УФ спектрофотометрии (СФ) и метода ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Преимуществом СФ определения является простота и высокая скорость

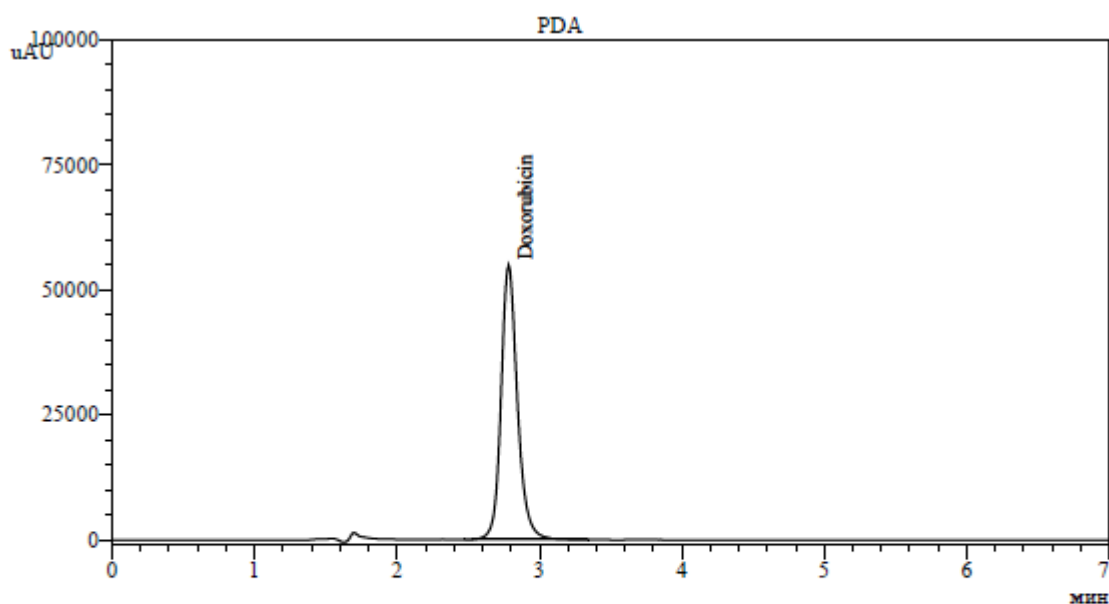
анализа, а также отсутствие расхода дополнительных реактивов, в отличие от метода ВЭЖХ. В то же время, СФ метод не позволяет разделить доксорубин и родственные примеси, которые имеют максимум поглощения на той же длине волны (480 нм).

В то же время, метод ВЭЖХ позволяет оценить содержание именно доксорубина в образце, поэтому может быть использован при исследовании стабильности образцов при хранении, а также при исследовании высвобождения ЛВ *in vitro* с учетом стабильности доксорубина в приемной среде. Параметры разработанной методики ВЭЖХ для количественного определения общего, а также свободного доксорубина, подробно описаны в разделе 2.4.7. Для сравнения результатов, полученных с использованием двух методов, общее содержание и степень включения доксорубина в НЧ оценивали для репрезентативной серии PLGA-Dox/7,4\* НЧ, при этом наночастицы отделяли в обоих случаях методом центрифугирования с ускорением  $48254 \times g$  в течение 30 мин при  $+5^\circ\text{C}$  с использованием ультрацентрифуги Avanti JXN-30, Beckman Coulter. При этом общее содержание доксорубина, определенное СФ, составило  $1,59 \pm 0,2$  мг/флакон, степень включения доксорубина –  $92,1 \pm 0,1\%$ ; измерение выполнено для 3 образцов одной серии. Средние значения содержания общего, свободного и включенного в НЧ доксорубина, определенные методом ВЭЖХ, представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Содержание общего, свободного и включенного в PLGA-Dox/7,4 НЧ, определенные методом ВЭЖХ

Показатель	Формула	S, мкВ х с	Значение G, ед. изм.
Доксорубин общий	$G_{\text{общ.}} = \frac{S}{23623} \times \frac{20}{1000}$	1955563	1,66 мг
Доксорубин свободный	$G_{\text{своб.}} = \frac{S}{23623} \times \frac{1,5}{0,2} \times \frac{20}{1000}$	437446	0,14, мг
Доксорубин, включенный в НЧ	$G_{\text{вкл.}} = \frac{G_{\text{общ.}} - G_{\text{своб.}}}{G_{\text{общ.}}} \times 100$	н/пр	91,6, масс.%

Типовая хроматограмма испытуемого раствора при определении свободного доксорубина приведена на рисунке 14.



&lt;&lt; PDA &gt;&gt;

ID#1 Название соединения: Doxorubicin

Наименование	Вр.уд.	Высота	Шум	Площадь	Асим.	Разр.(USP)	ЧТТ(USP)
3746 free 001.lcd	2.782	54812	27.70	437809	1.184	--	2568
3746 free 002.lcd	2.785	54972	31.27	437083	1.183	--	2582
Среднее	2.783	54892	29.48	437446	1.183	--	2575
%СКО	0.072	0.206	8.569	0.117	0.086	0.000	0.392
Максимум	2.785	54972	31.27	437809	1.184	--	2582
Минимум	2.782	54812	27.70	437083	1.183	--	2568
Стандартное Отклон.	0.002	113	2.53	513	0.001	--	10

Рисунок 14 – Хроматограмма испытуемого раствора образца PLGA-Dox/7,4 (свободный доксорубин)

Таким образом, методы СФ и ВЭЖХ позволяют получать близкие значения содержания общего доксорубина в образцах НЧ и могут быть использованы в фармацевтическом анализе данных форм. Для дальнейшего анализа данных параметров в настоящем исследовании использовали метод СФ.

Для оценки содержания примесей в образцах PLGA-Dox НЧ была адаптирована методика ВЭЖХ анализа, описанная в USP. В образцах лиофилизированных PLGA-Dox НЧ могут присутствовать как примеси, содержащиеся в исходной субстанции доксорубина гидрохлорида, так и продукты разложения, образующиеся в ходе получения НЧ и хранения. В соответствии с фармакопеей USP в субстанции доксорубина могут присутствовать следующие примеси: агликон доксорубина (доксорубинон), даунорубина гидрохлорид, даунорубинон. При этом USP устанавливает следующие пределы содержания примесей для лекарственной формы «доксорубина гидрохлорид для инъекций»: содержание доксорубинона и даунорубина не более 0,5%, любая неидентифицированная примесь не более 0,5%, сумма примесей не более 2,0%. Хроматограмма испытуемого раствора субстанции доксорубина в 0,1 % ТФК с концентрацией 516 мкг/мл (рН ≈ 2) приведена на рисунке 15. Содержание примесей в субстанции доксорубина представлено в таблице 19. Общее

содержание примесей составило 0,22 %.

Таблица 19 – Содержание примесей в субстанции доксорубина в 0,1 % ТФК с концентрацией 516 мкг/мл (рН ≈ 2)

Наименование	Относительное удержание	Площадь, мкВ х с	Содержание, %
Доксорубин	1,00	12147262	н/пр
Доксорубинон	1,09	15850	0,13
Даунорубин	1,19	1365	< 0,05
Неидентифицируемая	0,81	10696	0,09
Сумма		<b>12175173</b>	<b>0,22</b>

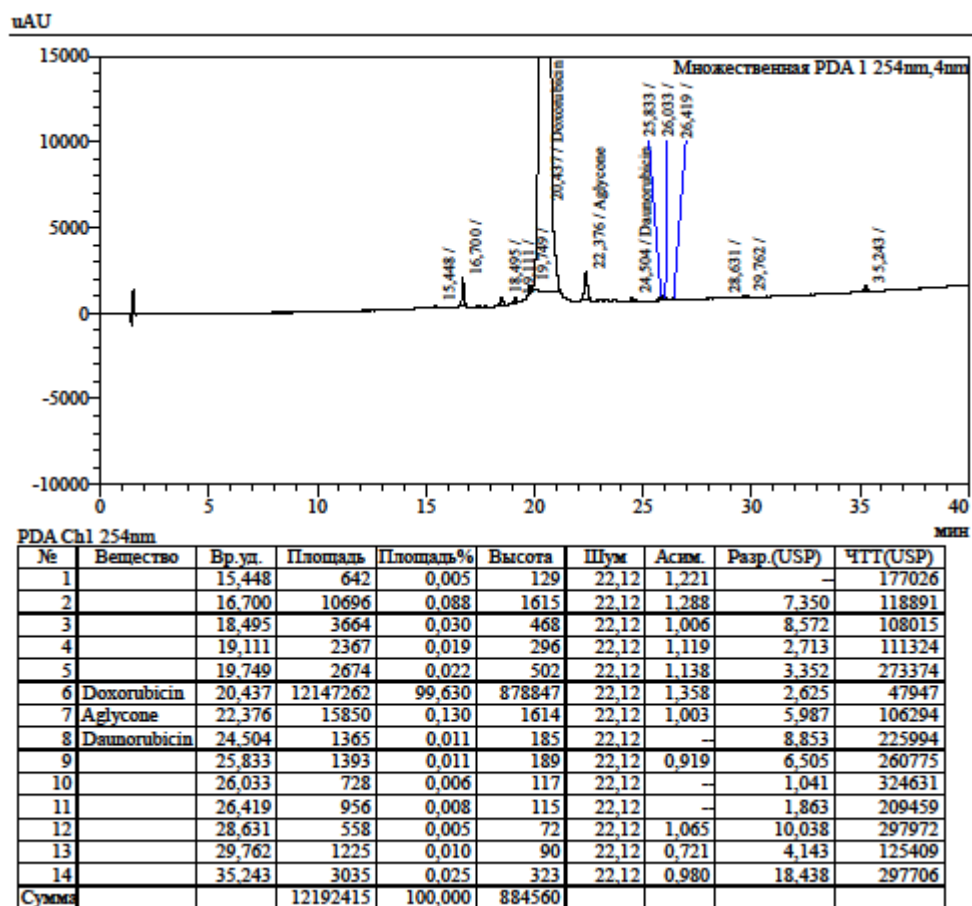


Рисунок 15 – Хроматограмма испытуемого раствора субстанции доксорубина в 0,1 % ТФК с концентрацией 516 мкг/мл (рН ≈ 2)

Далее, с использованием данной методики, проанализировали содержание примесей доксорубина в образцах PLGA-Dox/7,4 НЧ непосредственно после получения (таблица 20). Общее содержание примесей в образце составило 1,42%, а содержание единичных примесей не превышало 0,5 % для каждой. Аналогичным образом были проанализированы другие серии

PLGA-Dox НЧ, полученных при варьировании параметров технологического процесса. При этом общее содержание примесей в образцах не превышало 2,0% (данные не приведены).

Таблица 20 – Содержание примесей в образце PLGA-Dox/7,4 (репрезентативные данные)

Наименование	Относительное удерживание	Площадь, мкВ х с	Содержание, %
Доксорубицин	1,00	9030195	н/пр
Доксорубицинон	1,09	3880	Менее 0,05
Эпирубицин	1,04	0	Не обнаружен
Даунорубицин	1,19	1817	Следы
Неидентифицируемая	0,81	37306	0,41
Неидентифицируемая	0,96	6596	0,07
Неидентифицируемая	1,24	4520	0,05
Неидентифицируемая	1,28	22731	0,23
Неидентифицируемая	1,39	17257	0,19
Неидентифицируемая	1,44	35557	0,39
<b>Сумма</b>		<b>9159859</b>	<b>1,42</b>

Таким образом, с помощью выше описанных методом ВЭЖХ анализа можно осуществлять контроль качества полученных наноразмерных форм PLGA-Dox НЧ.

### 3.1.3. Оптимизация методов оценки степени включения доксорубицина в PLGA-Dox НЧ

Результаты, изложенные в настоящем разделе, описаны в статье [201]. Степень включения ЛВ в НЧ является одним из важных физико-химических параметров лекарственных форм на основе наночастиц. Изучение данного параметра требует применения особых методов анализа. В частности, для определения степени включения ЛВ в носитель (липосомы, полимерные НЧ) необходимо отделение носителя, содержащего включенное ЛВ, от свободного (не связанного с носителем) ЛВ с последующим анализом «свободной» фракции ЛВ и оценкой фракции (косвенной или прямой), связанной с носителем. Для отделения НЧ можно использовать методы центрифугирования, ультрафильтрации или гель-фильтрации, при этом выбор метода зависит от особенности конкретной наносомальной лекарственной формы [202-205]. В частности, важным параметром, определяющим пригодность метода, является эффективность отделения НЧ от дисперсионной среды, поскольку неполное отделение НЧ может привести к неточным (заниженным) оценкам степени включения.

В рамках настоящего исследования была проведена оптимизация методов оценки степени включения ЛВ в НЧ на примере двух типов НЧ, полученных методом «двойных эмульсий» при различных значениях pH внешней водной фазы (7,4/6,4) – PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4. Молекула доксорубина имеет амфифильный характер (рисунок 16), поэтому растворимость доксорубина в водной фазе зависит от значения pH. При снижении pH от нейтрального значения 7,4 до 6,4 происходит увеличение доли катионов с протонированной аминогруппой ( $pK_a=7,2-8,2$ ) и снижение доли цвиттер-ионов ( $pK_a$  аниона = 9,5) и основания доксорубина, что приводит к повышению его растворимости в воде и снижению растворимости в неполярных органических растворителях [206].

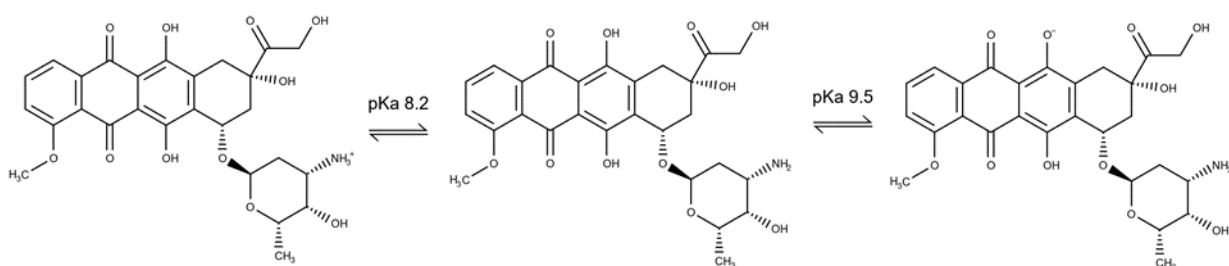


Рисунок 16 – Ионизация молекулы доксорубина в водных растворах

Поскольку изменение ионной формы амфифильной молекулы доксорубина приводит к изменению его растворимости в водной фазе при получении НЧ методом «двойных эмульсий», предполагалось, что путем варьирования pH внешней водной фазы двойной эмульсии (1 % раствор ПВС в PBS; pH 6,4 или 7,4) можно получить НЧ с разной степенью включения.

Как было отмечено выше, для определения включения ЛВ в НЧ необходимо отделение его несвязанной (свободной) фракции. Для выявления оптимального метода отделения НЧ в данном исследовании сравнивали методы центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации. В опыте использовали репрезентативные серии указанных наносомальных форм: PLGA-Dox/7,4\* и PLGA-Dox/6,4\*, имеющие средний гидродинамический диаметр  $98 \pm 3$  нм ( $\zeta$ -потенциал  $-10,90 \pm 0,27$  мВ) и  $142 \pm 2$  нм ( $\zeta$ -потенциал  $-4,79 \pm 0,33$  мВ), соответственно.

Результаты исследования степени включения тремя указанными методами подтвердили выдвинутое предположение: PLGA-Dox/7,4\* НЧ характеризуются более высокой степенью включения доксорубина по сравнению с PLGA-Dox/6,4\*. Таким образом, при более низком значении pH получены НЧ с большей фракцией свободного доксорубина. Можно представить, что в этом случае доксорубин в основном находится вблизи поверхности НЧ, слабее с ней связан и быстрее высвобождается. Это различие, вероятно, можно объяснить

изменением ионной формы амфифильной молекулы доксорубина, что приводит к повышению его растворимости в водной фазе и снижению сродства к гидрофобному полимеру PLGA, т.е. к снижению степени включения [207] при понижении pH среды от 7,4 до 6,4.

Было выявлено, что отделении НЧ методом центрифугирования основным фактором, оказывающим влияние на результат анализа, является ускорение. Как показано на рисунке 17, степень включения возрастает с увеличением ускорения, что связано с неполным осаждением НЧ при низком ускорении и, как следствие, завышенным содержанием доксорубина, определяемым в супернатанте.

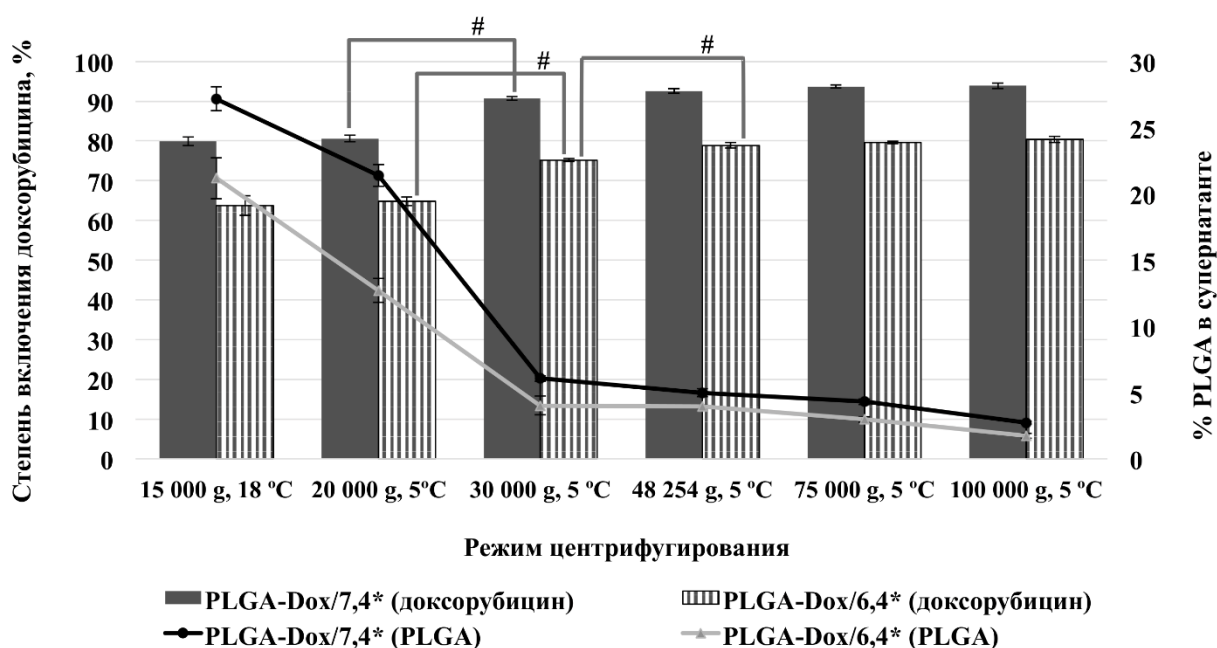


Рисунок 17 – Влияние режима центрифугирования на степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox/7,4\* и PLGA-Dox/6,4\* наночастицы и эффективность осаждения наночастиц по содержанию PLGA (%) в супернатанте (n = 6, среднее ± SD); # – p < 0,05 [201]

В среднем содержание PLGA в супернатанте при низком ускорении (15000 × g, +18 °C) составляет более 20 % от исходного (27,2±0,9 % для PLGA-Dox/7,4\* и 21,2 ± 1,6 % для PLGA-Dox/6,4\* соответственно), а при увеличении ускорения до 48254 × g снижается до значений менее 5 % (5,0±0,3 % для PLGA-Dox/7,4\* и 4,0±0,1 % для PLGA-Dox/6,4\* соответственно). При этом в первом случае наблюдается занижение степени включения доксорубина по сравнению со значениями, полученными при ускорении 48254 × g: 79,9±1,1 % vs 92,6±0,6 % (p < 0,05) для PLGA-Dox/7,4\* и 63,7±2,5 % vs 78,9±0,7 % (p < 0,05) для PLGA-Dox/6,4\* соответственно. Отметим, что осаждение PLGA-Dox/6,4\* происходит эффективнее, чем PLGA-Dox/7,4\* при любом режиме центрифугирования (p < 0,05); возможно, это происходит из-за склонности этих

НЧ к агрегации. Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) между значениями степени включения и содержания PLGA в супернатантах наблюдаются при центрифугировании с ускорением  $30000 \times g$  и менее ( $15000 \times g$  и  $20000 \times g$ ) для обоих типов НЧ. Помимо этого, для PLGA-Dox/6,4\* НЧ также отмечены статистически значимые различия между значениями степени включения при центрифугировании с ускорением  $30000 \times g$  и  $48254 \times g$  ( $p < 0,05$ ). Таким образом, необходимым и достаточным для эффективного осаждения НЧ обоих типов является ускорение  $48254 \times g$ : в этом случае остаточное содержание PLGA в супернатанте не превышает 5 % от исходного. В то же время для осаждения основной массы НЧ (более 90 %) приемлемым является ускорение более  $30000 \times g$ . В отличие от липосом аналогичного размера (около 100 нм), для осаждения которых методом центрифугирования требуется длительное время (10–20 ч) и ускорение более  $200000 \times g$  ввиду близкой плотности частиц и окружающей среды [203], твердые коллоидные частицы PLGA-Dox могут быть эффективно отделены от свободной фракции доксорубицина за короткое время.

При использовании метода ультрафильтрации для отделения НЧ от свободной фракции ЛВ важным фактором, влияющим на результат анализа, является сорбция свободного ЛВ на мембране. В таблице 21 приведены значения степени включения доксорубицина в НЧ PLGA-Dox/7,4\* и PLGA-Dox/6,4\* при отделении НЧ методом ультрафильтрации на фильтрах с разным диаметром пор. При использовании фильтров Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) с диаметром пор 50 и 100 кДа сорбция доксорубицина на фильтрах составила  $3,5 \pm 0,5$  % и  $1,9 \pm 0,5$  % соответственно ( $p < 0,05$ ). При использовании фильтров с диаметром пор 10 и 30 кДа заметно занижение содержания свободного доксорубицина в супернатанте, и, следовательно, некоторое завышение степени включения доксорубицина в НЧ в связи с более значительной сорбцией на фильтрах ( $17,6 \pm 0,8$  % и  $7,7 \pm 0,7$  % соответственно). При этом полимер в фильтрах даже в случае фильтров с NMWL 100 кДа (КЭФ) содержался в следовых количествах (менее 1 %), соответствующих содержанию водорастворимой фракции PLGA в НЧ. Таким образом, PLGA-Dox НЧ эффективно отделяются при ультрафильтрации, в отличие от липосом размером 100 нм, для которых отмечено прохождение через фильтры с аналогичным NMWL ввиду большей пластичности [203]. По-видимому, в отличие от центрифугирования при низких значениях ускорения, метод ультрафильтрации позволяет отделить наиболее мелкие НЧ, которые остаются в супернатанте. Таким образом, в данном случае метод ультрафильтрации при использовании фильтров с минимальной сорбцией (NMWL 50 или 100 кДа) может заменить метод центрифугирования при отсутствии в аналитической лаборатории высокоскоростной центрифуги (с ускорением более  $30000 \times g$ ).

Таблица 21 – Степень включения доксорубицина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом ультрафильтрации (n=6) [201]

Тип НЧ	Amicon® Ultra-0,5 (Millipore), NMWL			
	10 кДа	30 кДа	50 кДа	100 кДа
	Степень включения доксорубицина, %			
PLGA-Dox/7,4*	93,7 ± 0,6	93,2 ± 0,6	92,0 ± 0,4	91,8 ± 0,2
PLGA-Dox/6,4*	83,2 ± 0,2	77,5 ± 0,3	76,7 ± 0,4	76,4 ± 0,1

Помимо центрифугирования и ультрафильтрации, гель-фильтрация также широко используется для разделения свободного ЛВ и НЧ: НЧ быстро проходят сквозь гель, а свободное ЛВ удерживается в порах геля. Однако в отличие от первых двух методов, для которых степень включения оценивали косвенно, используя значения содержания свободного доксорубицина в супернатанте или фильтрате после отделения НЧ, в случае гель-фильтрации степень включения рассчитывали напрямую как отношение между соотношением массы доксорубицина к массе PLGA в НЧ после отделения свободной фракции на колонке и в исходных НЧ.

Для оценки влияния отношения объема образца к объему геля на эффективность разделения свободного доксорубицина и НЧ на колонку, заполненную гелем Sephadex® G-25, наносили образцы с различным соотношением объемов суспензии НЧ и геля: при соотношении 1:23–35 о/о были получены «отмытые» НЧ PLGA-Dox/7,4\*G-25(1) и PLGA-Dox/6,4\*G-25(1), при соотношении 1:5,8–7 о/о – «отмытые» НЧ PLGA-Dox/7,4\*G-25(2) и PLGA-Dox/6,4\*G-25(2). При этом рассчитывали отношение массы доксорубицина к массе PLGA в образце в «отмытых» и исходных НЧ.

Степень включения, определенная как отношение Dox:PLGA в «отмытых» НЧ к аналогичному показателю в исходных НЧ, была значительно ниже, чем рассчитанная косвенным методом при отделении НЧ методами центрифугирования и ультра-фильтрации (таблица 22). По всей видимости, при таком способе отделения НЧ при взаимодействии пробы с сорбентом создаются условия значительного разбавления, что приводит к существенному вымыванию доксорубицина с поверхности PLGA НЧ. При этом 5-кратное увеличение отношения объема наносимой пробы к объему колонки существенно сказалось на значении степени включения для НЧ, полученных при pH 6,4.

Таблица 22 – Степень включения доксорубицина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом гель-фильтрации, (n=6) [201]

Образец	Содержание доксорубицина (мг/флакон)	Содержание PLGA (мг/флакон)	Степень включения доксорубицина, %
PLGA-Dox/7,4*	1,71 ± 0,05	17,02 ± 0,96	-
PLGA-Dox/7,4*G-25(1)	0,333 ± 0,010	4,50 ± 0,02	73,8 ± 2,0
PLGA-Dox/7,4*G-25(2)	0,73 ± 0,01	9,82 ± 0,04	74,3 ± 2,0
PLGA-Dox/6,4*	1,67 ± 0,03	17,00 ± 0,57	-
PLGA-Dox/6,4*G-25(1)	0,045 ± 0,002	2,12 ± 0,01	21,6 ± 0,4
PLGA-Dox/6,4*G-25(2)	0,16 ± 0,01	5,90 ± 0,07	27,6 ± 0,5

Как было отмечено выше, в случае НЧ, полученных при pH 6,4, доксорубицин обладает большей растворимостью в воде и меньшим сродством к гидрофобной матрице PLGA. Вероятно, в этих НЧ доксорубицин находится в основном на поверхности и в приповерхностном слое; в условиях значительного разбавления (гель-фильтрация) ~80 % доксорубицина десорбируется с поверхности PLGA-Dox/6,4 НЧ и только 20 % остается связанным с НЧ и будет высвобождаться только в процессе их деградации. В отличие от липосом, представляющих собой замкнутый наноконтейнер с липидной оболочкой, для которых гель-фильтрация является обычным методом разделения свободного и инкапсулированного ЛВ [208], степень включения ЛВ в PLGA НЧ в большей степени зависит от градиента концентраций ЛВ в среде, поскольку в такой системе существует равновесие между адсорбцией и десорбцией.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что для определения степени включения доксорубицина в PLGA НЧ наилучшим образом подходит метод центрифугирования при ускорении  $>30000 \times g$ ; при этом оптимальным является ускорение  $48254 \times g$ . Данный метод с указанным ускорением центрифугирования был далее использован для анализа степени включения доксорубицина в НЧ для всех полученных наносомальных форм доксорубицина на основе PLGA. Меньшее ускорение приводит к неполному осаждению НЧ и занижению степени включения. Достоверно определять степень включения доксорубицина в НЧ можно также методом ультрафильтрации при использовании фильтров с NMWL 50 и 100 кДа. При использовании метода гель-фильтрации происходит значительная десорбция доксорубицина с поверхности и приповерхностного слоя НЧ, что приводит к занижению степени включения. Тем не менее, метод гель-фильтрации в данном случае позволяет оценить сколько доксорубицина находится внутри матрицы или прочно с ней связано.

### 3.1.4. Количественная оценка содержания ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ

Поливиниловый спирт (ПВС) является наиболее часто используемым эмульгатором при получении НЧ на основе полилактидов и сополимеров молочной и гликолевой кислот [209; 210]. Известно, что даже при многократной отмывке НЧ, часть ПВС остается связанной с НЧ [211]. В работе S. K. Sahoo и соавт. показано, что величина остаточного ПВС влияла на различные фармацевтические свойства PLGA НЧ, такие как размер частиц, дзета-потенциал, индекс полидисперсности, гидрофобность поверхности, нагрузка ЛВ, а также незначительно влияла на высвобождение ЛВ *in vitro*. Важно отметить, что для НЧ с более высоким количеством остаточного ПВС было отмечено относительно меньшее клеточное поглощение, несмотря на меньший размер частиц [212]. Поскольку отделение ПВС в процессе многократной отмывки НЧ приводит так же к отделению свободной фракции доксорубина, в случае наносомальных форм PLGA-Dox отделение не связанного ПВС не проводили.

Общее содержание ПВС (9–10 кДа, степень гидролиза 80%) в образцах лиофилизата НЧ контролировали путем разрушения НЧ посредством щелочного гидролиза с дальнейшим образованием окрашенного комплекса синего цвета ПВС с  $I_2$  в KI в присутствии борной кислоты. Концентрацию ПВС определяли спектрофотометрически на длине волны 673 нм с использованием предварительно построенной калибровочной кривой в диапазоне 1-20 мкг/мл (рисунок 18). В таблице 23 представлены результаты измерения общего содержания ПВС в образцах репрезентативных серий PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ; для анализа содержания ПВС использовали 10 флаконов каждой серии (n=10).



Рисунок 18 – Калибровочные растворы для определения ПВС: справа налево концентрация ПВС увеличивается, оранжевая окраска раствора  $I_2$  в KI сменяется зеленой в результате образования комплекса синего цвета ПВС с  $I_2$  в KI в присутствии борной кислоты с длиной волны поглощения 673 нм

Таблица 23 – Содержание ПВС во флаконе PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4; репрезентативные данные, среднее значение  $\pm$  SD (n=10)

Тип НЧ	Содержание PLGA во флаконе, мг	Содержание ПВС во флаконе, мг	Отношение ПВС:PLGA, мг/мг
PLGA-Dox/7,4	16,34	8,27 $\pm$ 0,24	1:1,62
PLGA-Dox/6,4	16,60	10,34 $\pm$ 0,75	1:1,60

Таким образом, содержание ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ коррелировало с содержанием PLGA в образцах НЧ, поскольку в процессе синтеза при разбавлении наноземульсии происходит уменьшение концентрации как полимера, так и ПВС. Данный метод может быть в дальнейшем использован в контроле качества наносомальных форм PLGA-Dox.

### 3.1.5. Определение содержания влаги в образцах лиофилизированных НЧ PLGA-Dox

Лиофилизация является хорошим методом повышения долгосрочной стабильности коллоидных носителей ЛВ [213; 214]. Содержание воды в образцах лиофилизированных НЧ является важным показателем качества, определяющим время сохранения первоначальных свойств наносомальной формы, таких время ресуспендирования лиофилизата, размер НЧ, степень включения ЛВ и профиль высвобождения, поскольку избыточное содержание влаги может приводить к гидролизу полимерной матрицы и нежелательному высвобождению ЛВ, а также слипанию НЧ и образованию агрегатов в процессе хранения.

Для определения содержания воды в PLGA-Dox НЧ использовали термогравиметрический метод (ТГА), который заключается в измерении потери массы при высушивании образца. Исследование проводили для двух типов НЧ: PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4, лиофилизированных в присутствии маннита в концентрации 5 % (масс./об.), поскольку данный тип и концентрация криопротектора позволили в лучшей степени сохранить исходные параметры НЧ, как было отмечено выше. При этом потеря в массе при высушивании (остаточная влажность) PLGA-Dox/7,4 НЧ составила 1,39 $\pm$ 0,21 %, а PLGA-Dox/6,4 – 1,25 $\pm$ 0,13 %. На рисунке 19 полученные в результате анализа термограммы (представлены репрезентативные данные).

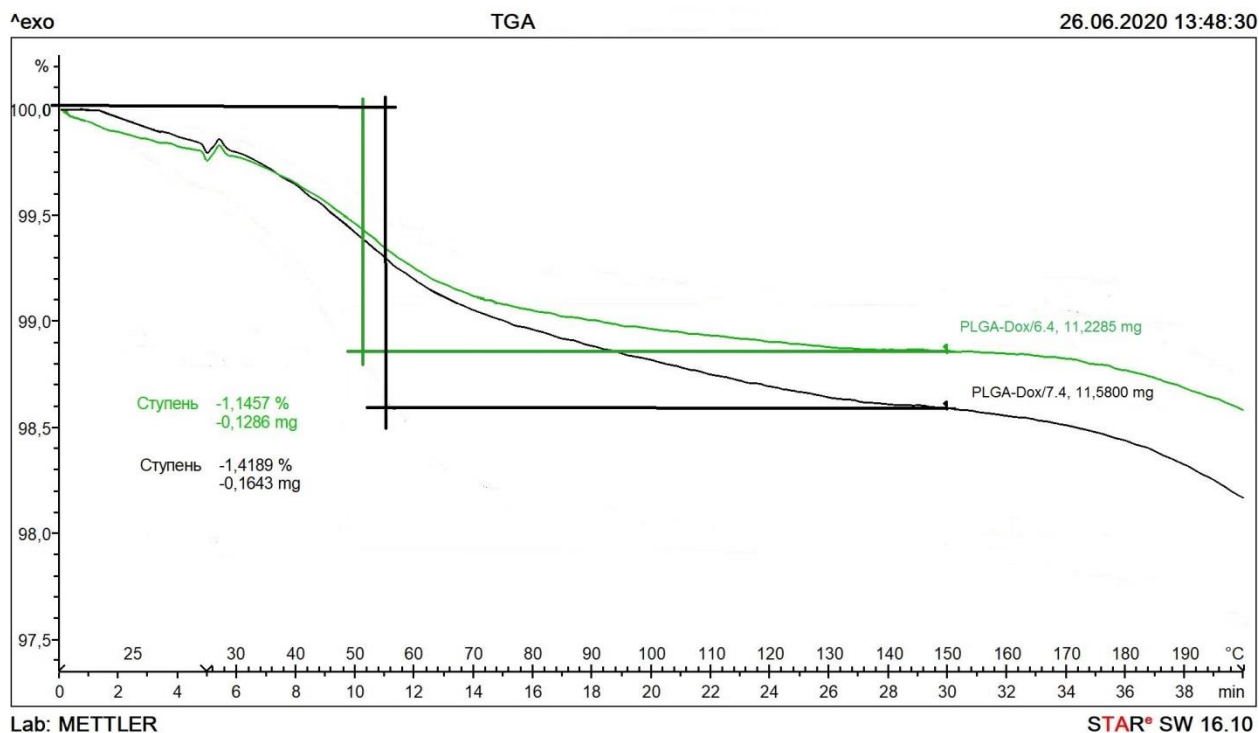


Рисунок 19 – Термограмма образцов PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ

Кроме того, содержание воды в образцах определяли методом кулонометрического титрования по К. Фишеру. Содержание воды в образцах PLGA-Dox/7,4 составило  $1,41 \pm 0,13$  %, PLGA-Dox/6.4 ( $n=3$ )  $1,29 \pm 0,20$  %. Таким образом, значения содержания воды в лиофилизированных образцах НЧ не превышало  $\approx 2\%$ .

### 3.1.6. Стабильность PLGA-Dox и плацебо-PLGA НЧ при хранении

Стабильность наноразмерных форм при хранении (долгосрочном и ускоренном) является важным показателем качества. В процессе хранения могут изменяться такие ключевые параметры НЧ, как скорость ресуспендирования, размер НЧ и распределение по размерам,  $\zeta$ -потенциал, степень включения действующего вещества и его общее содержания, содержание примесей, а также скорость высвобождения ЛВ *in vitro*. Соответственно, для всех полученных в настоящем исследовании PLGA-Dox НЧ данные показатели определяли через 3 и 6 месяцев хранения в условиях холодильника ( $+5 \pm 2$  °C). Чтобы оценить влияние присутствия доксорубина в лекарственной форме, скорость ресуспендирования, размер, PDI,  $\zeta$ -потенциал поверхности и скорость ресуспендирования измеряли для образцов плацебо-PLGA-НЧ. Как показали результаты исследований, все полученные образцы сохраняли первоначальные характеристики на протяжении срока хранения (6 месяцев). В таблице 24 приведены физико-химические параметры репрезентативных серий плацебо-НЧ и нагруженных доксорубином

(PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4) НЧ, полученных на основе Resomer® 502Н, в начале и конце экспериментального срока хранения. При этом общее содержание примесей доксорубина (ВЭЖХ) в образцах PLGA-Dox не превышало 2,0 %.

Таблица 24 – Физико-химические параметры плацебо-PLGA и PLGA-Dox НЧ при хранении (0-6 месяцев; температура –  $+5\pm 2$  °C); средние значения  $\pm$  SD; n = 3

Тип НЧ	Время хранения (+5±2 °C)	Средний размер, нм	PDI	ζ-потенциал, мВ	Степень включения доксорубина	Ресуспендируемость
Плацебо-PLGA	0	97,6 ± 1,2	0,121 ± 0,017	-34,2 ± 1,0	-	Полная
	6 месяцев	97,9 ± 0,1	0,120 ± 0,011	-33,6 ± 1,1	-	Полная
PLGA-Dox/7,4	0	113,7 ± 0,8	0,144 ± 0,011	-9,52 ± 0,24	91,46 ± 0,2	Полная
	6 месяцев	115,4 ± 0,6	0,151 ± 0,023	-10,11 ± 0,12	91,76 ± 0,3	Полная
PLGA-Dox/6,4	0	142,1 ± 1,6	0,252 ± 0,022	-4,79 ± 0,311	78,91 ± 0,6	Полная
	6 месяцев	147,5 ± 3,6	0,271 ± 0,045	-5,01 ± 0,311	79,3 ± 0,5	Полная

### 3.2. Оптимизация методов изучения и подходов к математическому описанию кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vitro* в модельные среды и плазму

Механизм высвобождения ЛВ из НЧ PLGA представляет собой сложный процесс. При разбавлении суспензии вначале происходит быстрая десорбция ЛВ с поверхности НЧ в приемную среду («burst-effect»), затем высвобождение ЛВ происходит в основном за счет диффузии из полимерной матрицы. В дальнейшем к диффузии ЛВ присоединяются и процессы эрозии и разрушения полимерной матрицы [215]. Для точного описания высвобождения ЛВ из НЛФ необходимо выбрать и оптимизировать метод, наиболее чувствительный к изменениям состава и свойств ЛФ, но при этом менее чувствительный к изменениям условий проведения эксперимента (смена среды растворения, изменение объема пробы и т.д.). В рамках настоящей работы в первую очередь предстояло разработать и оптимизировать методы изучения кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ с различной степенью включения доксорубина, а также обосновать подходы к ее математическому описанию. Далее было изучено влияние некоторых технологических факторов, использованных при получении PLGA-Dox НЧ, на скорость и профиль высвобождения доксорубина *in vitro*.

### 3.2.1. Выбор метода исследования кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox наночастиц

Известно, что доксорубин является весьма сложным объектом для анализа. Он взаимодействует со всем видами ионов, образует комплексы с двух- и трехвалентными металлами, сорбируется на стеклянных и пластиковых поверхностях, образует само-ассоциаты и разлагается в водных растворах (возможны фоторазложение, окисление и гидролиз), причем степень его деградации зависит от его (доксорубина) концентрации, pH и температуры раствора и даже от концентрации и состава буфера [216]. Поэтому изучение кинетики его накопления в водных средах весьма затруднительно и может носить лишь оценочный, сравнительный характер, если собственно процесс деградации доксорубина не является собственно предметом исследования. ВЭЖХ является, безусловно, наиболее адекватным методом определения концентрации доксорубина, поскольку позволяет выделить его из сложной смеси, содержащей, помимо основного вещества, сложную смесь продуктов его деградации [217; 218; 219]. Проблема заключается в том, что, не имея стандартов для всех имеющихся в смеси соединений, невозможно определить их количество, а значит – невозможно и определить суммарную концентрацию оставшегося и подвергшегося разложению доксорубина. Спектрофотометрия (СФ), безусловно, является самым простым и быстрым, но, с другой стороны, наименее точным методом определения концентрации доксорубина. С одной стороны, плоские достаточно гидрофобные молекулы доксорубина склонны к образованию более энергетически выгодных «пачек» в водных растворах, что может оказывать влияние не только на интенсивность флуоресценции, но и на величину светопоглощения растворов. С другой стороны, на интенсивность (величину) светопоглощения растворов доксорубина влияет кислотность среды. Наконец, в водных средах с кислотностью выше pH 4, и особенно в районе нейтральной и выше, молекулы доксорубина подвергаются деградации (фото-, гидролитической, окислительной), наличие продуктов которой невозможно учесть спектрофотометрически. Поэтому для определения доксорубина в растворах обычно используют метод ВЭЖХ. В то же время, хотя СФ метод не позволяет с абсолютной точностью определять концентрацию доксорубина на фоне продуктов его деградации, данный метод можно с некоторой осторожностью использовать для оценки/сравнения между собой процессов высвобождения доксорубина из НЧ а) в одних и тех же условиях; б) в достаточно низких концентрациях доксорубина (когда образование «пачек» практически исключено) и при значениях pH среды и времени, когда количество продуктов деградации доксорубина сравнительно невелико и не слишком сильно сказывается на точности СФ определения доксорубина. Поэтому использование данного метода (после дополнительной проверки

методом «введено-найдено» в используемых средах и концентрациях) было признано допустимым для данных экспериментальных условий.

Утвержденными FDA методами изучения кинетики высвобождения *in vitro* являются диализ, проточная ячейка и метод разделения (ультрацентрифугирование и ультрафильтрация) [220]. Особенности и недостатки каждого метода подробно рассмотрены в [221]. Современные модели высвобождения *in vitro* в разной степени способны имитировать скорость, транспортные и равновесные процессы, в которые лекарственное вещество может быть вовлечено в месте введения, однако, они все же не позволяют полностью имитировать среду *in vivo* [222].

Большинство методов изучения профиля высвобождения ЛВ из НЧ *in vitro* основаны на отделении частиц от среды, в которой они были диспергированы, и количественном определении «свободной» фракции ЛВ для косвенной оценки фракции, связанной с НЧ. В литературе описаны многочисленные методы разделения свободного и связанного с НЧ ЛВ, включая ультрацентрифугирование [205], ультрафильтрацию центробежную [223] и под давлением [224]. Потенциальная проблема, связанная с использованием любого из вышеупомянутых способов физического разделения, заключается в том, что разделение может быть неполным или неэффективным. Визуально обнаружить присутствие небольшого количества НЧ в фильтрате или супернатанте отдельного образца невозможно, в то же время их присутствие может привести к значительным ошибкам измерения, особенно на ранних этапах оценки высвобождения, когда концентрация ЛВ в частицах носителя высока по сравнению с концентрацией свободного ЛВ. Соответственно при использовании данных методов необходимо подтверждать полноту отделения НЧ, например, по размеру частиц в супернатанте методом DLS [203].

Метод диализа, включая параллельный, в мешке и обратный [225], также широко используют для изучения профиля высвобождения ЛВ из коллоидных носителей [226]. Преимуществом диализа является возможность физически отделить частицы от свободного ЛВ. Однако процесс диффузии ЛВ через мембрану может стать фактором, лимитирующим скорость поступления ЛВ в камеру-поглотитель, поэтому необходимо подбирать материал и размер пор мембраны с учетом свойств ЛВ.

В настоящем исследовании в качестве методов отделения наночастиц от свободного доксорубина при изучении кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ были рассмотрены центрифугирование и диализ. Оптимизацию данных методов проводили, используя образцы PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ, а также отмытых от свободной фракции доксорубина PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/7,4(G-25). Усредненные физико-химические параметры данных типов НЧ приведены в таблицах 25 и 26.

Таблица 25 – Физико-химические характеристики неотмытых и отмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ (n=3)

Образец НЧ	Размер, нм	PDI	ζ-потенциал, мВ
PLGA-Dox/7,4	105 ± 12	0,144 ± 0,001	-10,46 ± 1,33
PLGA-Dox /6,4	137 ± 7	0,301 ± 0,069	-6,90 ± 2,98
PLGA-Dox/7,4(G-25)	109 ± 5	0,135 ± 0,006	-21,00 ± 1,28
PLGA-Dox/6,4(G-25)	144 ± 6	0,244 ± 0,014	-20,90 ± 0,57

Таблица 26 – Степень включения и нагрузка доксорубина в неотмытых и отмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ (n=3)

Образец наночастиц	Степень включения доксорубина, %	Нагрузка доксорубина, %
PLGA-Dox/7,4	91,0 ± 0,7	9,1 ± 0,3
PLGA-Dox /6,4	79,7 ± 1,1	7,8 ± 0,1
PLGA-Dox/7,4(G-25)	97,6 ± 0,6	7,3 ± 0,2
PLGA-Dox/6,4(G-25)	97,7 ± 0,4	2,6 ± 0,1

Как уже было отмечено выше, НЧ, полученные при pH 6,4 отличаются более низкой степенью включения доксорубина по сравнению с полученными при pH 7,4. Можно представить, что в этом случае доксорубин в основном находится вблизи поверхности НЧ, слабее с ней связан и быстрее высвобождается. При отделении свободной фракции доксорубина методом гель-фильтрации нагрузка доксорубина (%) особенно снизилась в случае PLGA-Dox/6,4, что подтверждает гипотезу о приповерхностном расположении доксорубина в НЧ (таблица 26). Некоторое увеличение абсолютной величины заряда НЧ после гель-фильтрации, вероятно, можно объяснить уменьшением количества доксорубина, связанного с полимером на поверхности НЧ, особенно существенное для НЧ с более низким включением, и увеличением числа свободных карбоксильных групп полимера, заряд которых до гель-фильтрации был в большей степени скомпенсирован за счет связывания с молекулами доксорубина. Таким образом, для оптимизации метода оценки кинетики высвобождения *in vitro* использовали данные типы НЧ с различной степенью включения и нагрузкой доксорубина в НЧ.

### 3.2.1.1. Метод центрифугирования для изучения профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ

Методику изучения профиля высвобождения доксорубина из НЧ методом центрифугирования оптимизировали путем варьирования следующих параметров:

- Приемная среда: вода; 0,9 % раствор хлорид натрия; PBS (pH=7,4); 1 % раствор полоксамера 188, 1 % раствор полисорбата 80; HEPES буфер (0,1 моль/л, pH=7,4);
- Режим центрифугирования:  $15000 \times g$ ;  $48254 \times g$ ;
- Разбавление:  $\approx 340$  мкг/мл (далее 1:5);  $\approx 68$  мкг/мл (далее 1:25);
- Температура инкубации:  $+25$  °C;  $+37$  °C.

Критерием для выбора приемной среды является возможность поддержания агрегативной и седиментационной устойчивости НЧ в процессе анализа, а также достаточная растворимость в ней ЛВ, т.е. отсутствие осадка НЧ и ЛВ и их соосаждения в течение эксперимента. Как показали предварительные эксперименты, инкубация PLGA-Dox НЧ в средах, обычно применяемых для моделирования физиологических условий *in vitro* (PBS, 0,9 % NaCl), приводит к потере агрегативной устойчивости НЧ и выпадению осадка. Так, при инкубации PLGA-Dox НЧ в 0,9% NaCl при температуре  $+37$  °C в течение 24 часов средний размер НЧ, определяемый методом DLS, увеличивался за счет образования микронных агрегатов (рисунок 20). По-видимому, высокая ионная сила этих сред приводит к компенсации заряда НЧ, что и является причиной их агрегации [227; 228].

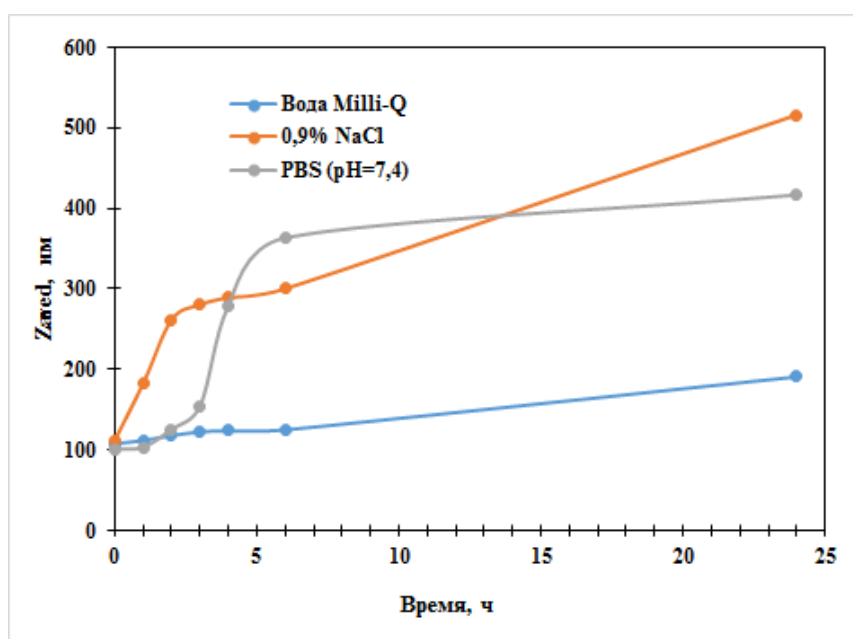


Рисунок 20 – Размер PLGA-Dox/7,4 НЧ при инкубации в воде, фосфатном буфере (PBS, pH=7,4) или 0,9 % растворе хлорида натрия;  $+37$  °C

Первоначально была исследована возможность использования в качестве приемной среды 0,1 М HEPES буфера (pH=7,4) для имитации pH в кровотоке; однако в данной среде через 24 ч инкубации также наблюдалось выпадение осадка доксорубина и PLGA-Dox НЧ, после указанного времени не наблюдалось прироста концентрации доксорубина в супернатанте. Для обеспечения стабильности суспензии НЧ и солюбилизации доксорубина в качестве приемной среды также использовали растворы ПАВ с концентрацией выше ККМ: 1 % раствор полуксамера 188 и 1 % раствор полисорбата 80 (рисунок 21). При этом, в среде 1 % полисорбата 80 через 24 ч инкубации наблюдалось выпадение осадка, а скорость высвобождения доксорубина была существенно выше, чем при использовании другого ПАВ – 1 % раствора полуксамера 188; при этом агрегация НЧ была особенно характерна для PLGA-Dox/6,4 НЧ (рисунок 22).

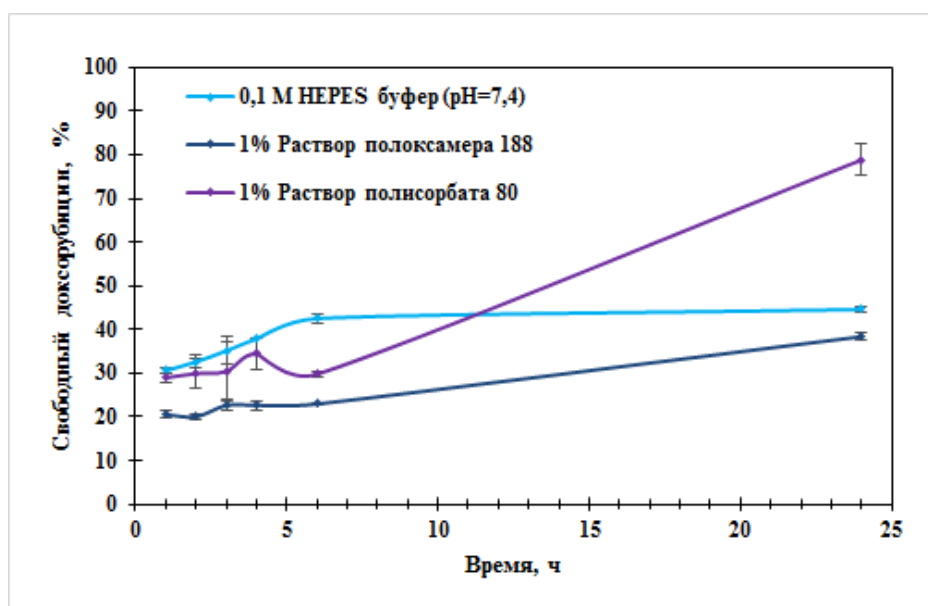


Рисунок 21 – Кинетика высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 НЧ в 0,1 М HEPES буфере с pH=7,4 (голубой), 1 % растворе полуксамера 188 (синий) и 1 % растворе полисорбата 80 (фиолетовый); температура инкубации +37 °С; разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугирование при ускорении  $48254 \times g$ ; n=3

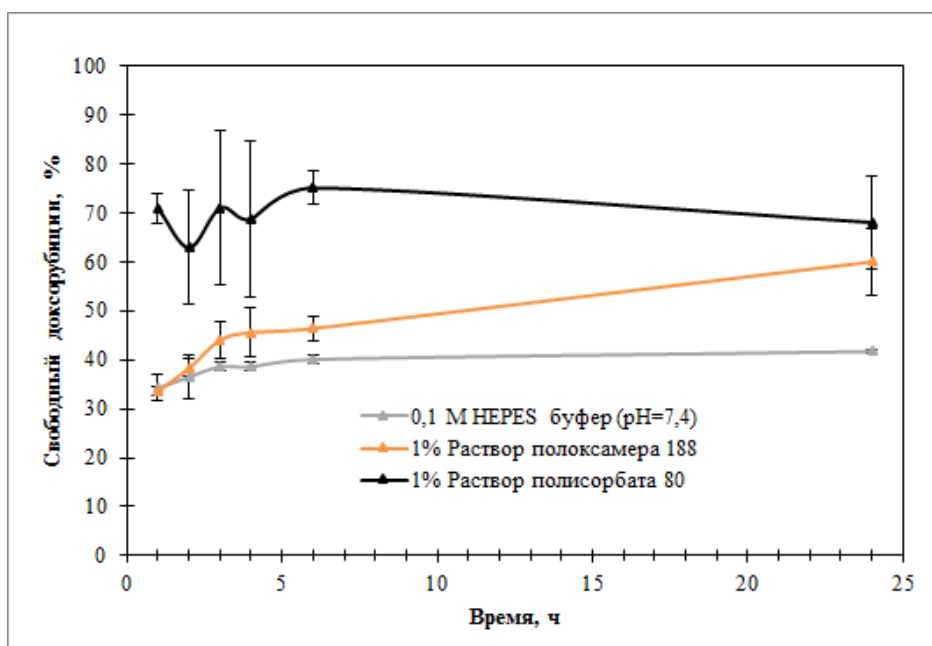


Рисунок 22 – Кинетика высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/6,4 НЧ в 0,1 М НЕРЕС буфере с рН=7,4 (голубой), 1 % растворе полоксамера 188 (синий) и 1 % растворе полисорбата 80 (фиолетовый); температура инкубации +37 °С; разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугирование при ускорении  $48254 \times g$ ;  $n=3$

Напротив, использование 1 % раствора полоксамера 188 в качестве приемной среды позволило избежать укрупнения НЧ, агрегации и выпадения осадка. В концентрациях выше ККМ (в нашем случае 0,32 %) полоксамер 188 адсорбируется на поверхности НЧ в виде гемимицелл [193], обеспечивая электростатическое отталкивание НЧ. При длительной инкубации водной суспензии НЧ также наблюдали появление незначительного осадка, однако профили высвобождения были близки к полученным в 1 % полоксамер 188 (данные не приведены), поэтому вода также может быть использована в качестве приемной среды.

При повышении температуры среды скорость высвобождения доксорубина из НЧ увеличивалась (рисунок 23), что можно объяснить ускорением диффузии ЛВ из матрицы НЧ [229]. Так, содержание свободного доксорубина через 6 ч инкубации для PLGA-Dox/7,4 при +37 °С было на 17% выше, чем при +25 °С; через 48 и 120 ч разница составила 36 и 40% соответственно.

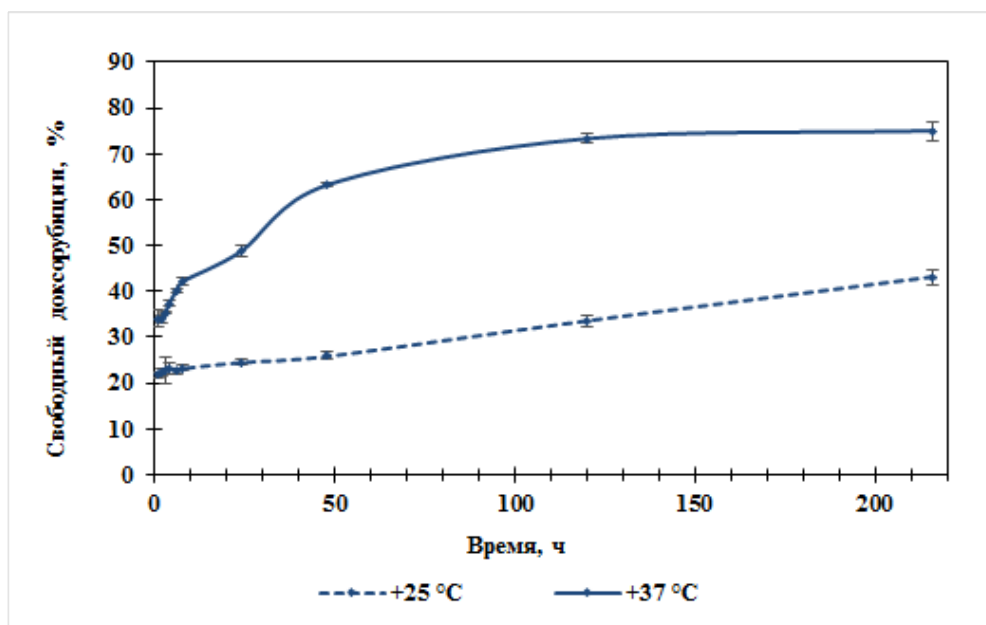


Рисунок 23 – Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 НЧ в 1 % растворе полоксамера 188 при разных температурах инкубации: +25 (пунктирная линия) и +37 °C (сплошная линия); разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугирование при ускорении  $15000 \times g$ ;  $n=3$

Далее было продемонстрировано, что сдвиговое напряжение, возникающее во время центрифугирования под воздействием приложенного центробежного ускорения, а также степень разбавления суспензии НЧ оказывают сильное влияние на профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ. Повышение ускорения центрифугирования для обоих типов НЧ привело к снижению содержания доксорубицина в супернатанте в среднем на 10 % (рисунок 24, разведение 1:25). При этом за счет более высокого ускорения количество НЧ в супернатанте снизилось на 16 %: при центрифугировании с ускорением  $15000 \times g$  содержание полимера в супернатанте составляло 26 % от исходного количества, а при ускорении  $48\,254 \times g$  – всего лишь 10 % (с учетом 3-5 % фракции растворимого мономера PLGA в образцах НЧ). Таким образом, НЧ, остающиеся в супернатанте после центрифугирования, приводят к завышению определяемого содержания свободного доксорубицина.

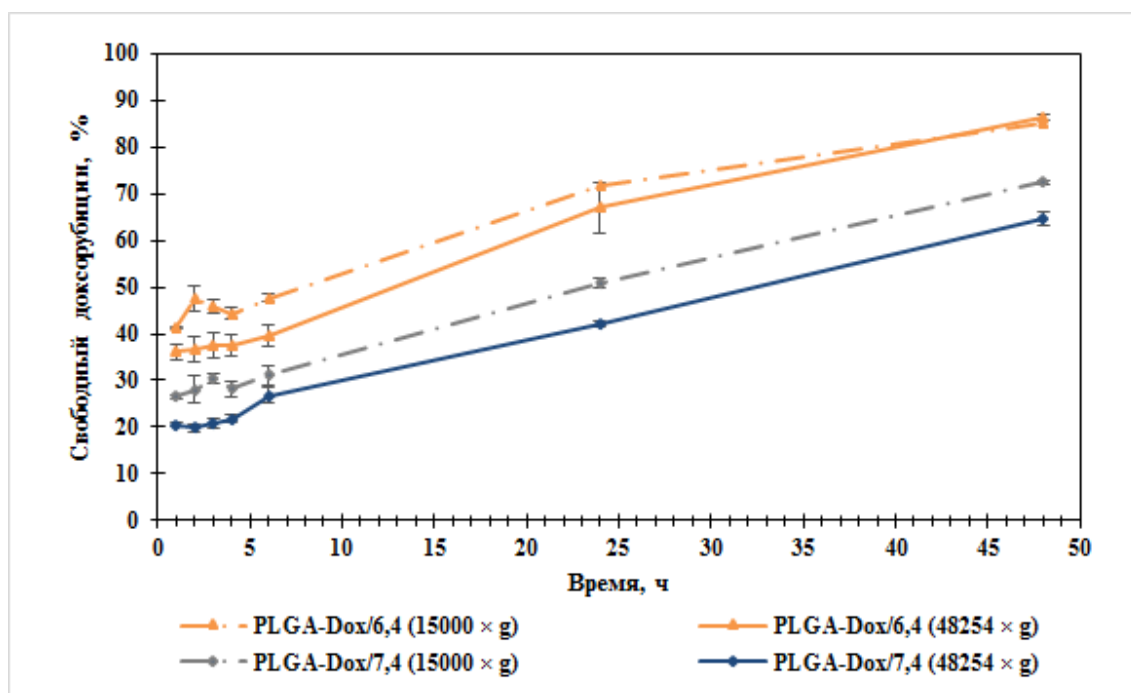


Рисунок 24 – Кинетика высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) НЧ в 1 % растворе P188; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С. Влияние режима центрифугирования: 15000 × g, +18 °С (пунктирная линия) и 48254 × g, +5 °С (сплошная линия); n=3

НЧ PLGA-Dox/6,4 по сравнению с PLGA-Dox/7,4 отличались более высокой скоростью высвобождения доксорубина и величиной «burst-effect», что показано для обоих режимов центрифугирования. Следует отметить, что с течением времени влияние скорости центрифугирования на содержание свободного доксорубина для PLGA-Dox/6,4 уменьшается вследствие уменьшения содержания доксорубина в матрице НЧ. Помимо недостаточного осаждения НЧ и, соответственно, завышения концентрации определяемого доксорубина в супернатанте, для низкоскоростного режима центрифугирования (15000 × g, +18 °С) также было отмечено влияние объема центрифугируемой суспензии на содержание определяемого в супернатанте доксорубина в первые часы; в связи с этим изменение объема центрифугируемой пробы приводило к существенной вариабельности определяемых значений свободного доксорубина. Так, для PLGA-Dox/7,4 при увеличении объема образца с 0,5 до 1 мл происходило увеличение определяемого количества доксорубина в супернатанте на 11,3 % через 1 час инкубации и на 8,2 и 6,6 % через 6 и 48 ч соответственно, что свидетельствует о недостаточном осаждении НЧ при увеличении объема пробы. В случае НЧ с более низким включением влияние этого фактора было не столь значительным.

Профили высвобождения доксорубина из НЧ PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 получены для 2 вариантов разведения: 1:5 (общая концентрация доксорубина ≈ 330-340

мкг/мл) и 1:25 (общая концентрация доксорубицина  $\approx$  68-70 мкг/мл). При увеличении разведения в 5 раз содержание свободного доксорубицина для PLGA-Dox/6,4 в среднем увеличивалось на 15 % в первые часы, в то время как для PLGA-Dox/7,4 – всего на 8 %, что связано с меньшей степенью включения в матрицу НЧ в первом случае (ускорение  $48254 \times g$ ,  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). При увеличении степени разведения повышалась не только величина «burst-effect», но и скорость высвобождения, особенно для PLGA-Dox/6,4 (рисунок 25).

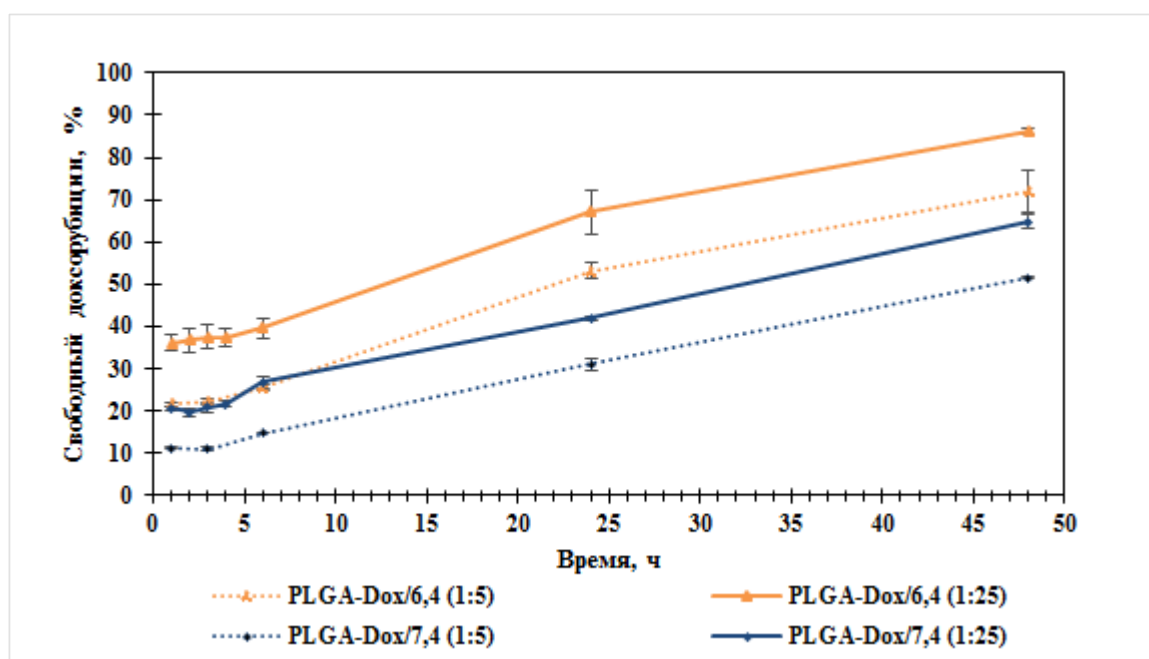


Рисунок 25 – Высвобождение доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) НЧ в 1 % растворе полоксамера 188, температура инкубации  $+37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Влияние степени разведения: 1:5 (пунктирная линия) и 1:25 (сплошная линия). Отделение наночастиц методом центрифугирования ( $48254 \times g$ ,  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ );  $n=3$

Кроме того, было отмечено, что при разведении 1:5 НЧ PLGA-Dox/7,4 лучше осаждаются, чем при разведении 1:25 (ускорение  $48254 \times g$ ,  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ ): содержание полимера в супернатанте составило 2 и 10% от общего ( $p < 0,05$ ) соответственно. Таким образом, степень разведения оказывала влияние как на высвобождение доксорубицина из НЧ, так и на эффективность осаждения НЧ при центрифугировании.

### 3.2.1.2. Метод диализа для изучения профиля высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ

Диализ также является одним из рекомендованных FDA методов для изучения кинетики высвобождения ЛВ из лекарственной формы. Метод диализа является одним из широко

используемых методов изучения кинетики высвобождения ЛВ из различных наноразмерных систем доставки *in vitro*, в том числе липосом [230], эмульсий, наночастиц на основе полимеров и твердых липидов [231].

Однако, как показали результаты данного исследования, применение диализа для изучения кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 НЧ нежелательно ввиду ограниченной диффузии доксорубина через мембрану. При выборе мембраны для диализа необходимо учитывать возможность сорбции ЛВ на мембране (лимитирующий фактор – материал мембраны), а также молекулярную массу отсечки (MWCO, *англ.* Molecular weight cut-off /NMWL, *англ.* Nominal molecular weight limit), которая должна примерно в 100 раз превышать размер молекулы ЛВ [232]. Несмотря на предварительную инкубацию диализной мембраны в растворе доксорубина во избежание его сорбции при первичном контакте с образцом, концентрация доксорубина в приемной среде в течение первых 6 ч была существенно ниже, чем при использовании метода центрифугирования (рисунок 26).

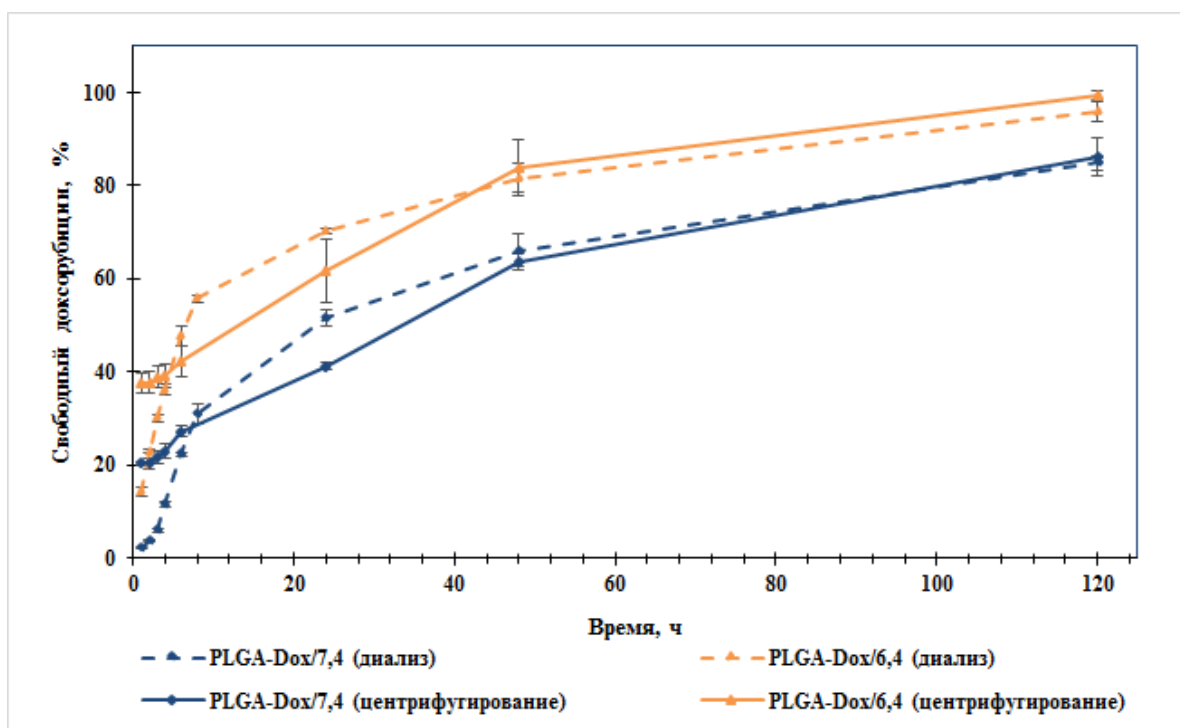


Рисунок 26 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в воде при отделении НЧ методом диализа (пунктирная линия) и в 1% полоксамере 188 при отделении НЧ центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$ ; температура инкубации  $+37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; разведение 1:25 (n=3)

Через 1 ч содержание свободной фракции доксорубина, определенное методом диализа, было ниже для обоих типов НЧ, чем полученное методом центрифугирования при

ускорении  $48254 \times g$  для отмытых методом гель-фильтрации PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/7,4(G-25) НЧ на 7 и 13% (рисунок 27), соответственно. Таким образом, при использовании диализа низкие концентрации в приемной среде связаны именно с ограничением диффузии доксорубицина через мембрану, а не с удалением свободной фракции доксорубицина при смене среды. Аналогичные данные получены Y. Zambito и соавт. [233] для НЧ на основе хитозана, нагруженных диклофенаком или офлоксацином: хотя данные кинетики ЛВ в приемной среде можно было интерпретировать с точки зрения замедленного высвобождения из НЧ, данные кинетики в матрице НЧ показывают, что для обоих ЛВ этот процесс фактически контролировался их проникновением через диализную мембрану. F. Jung и соавт. в своей работе [166] также отмечали более медленное накопление в приемной среде флурбипрофена при использовании DR (англ. dispersion releaser technology) технологии для оценки кинетики его высвобождения из НЧ на основе поли-ε-капролактона с применением диализной мембраны.

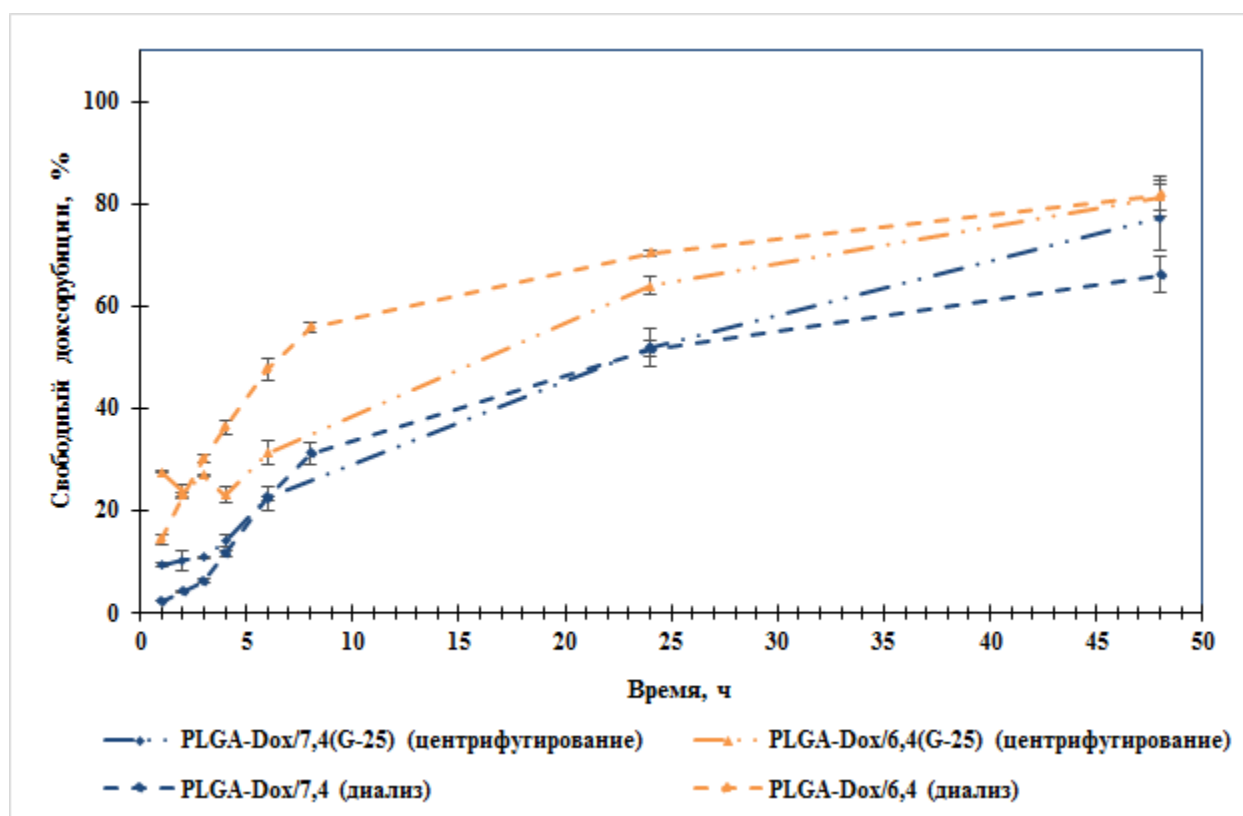


Рисунок 27 – Профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в воде при отделении НЧ методом диализа и из отмытых PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/7,4(G-25) в 1% полоксамере 188 при отделении НЧ центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$ ; температура инкубации  $+37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; разведение 1:25 (n=3)

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что диализ в случае доксорубицина не позволяет получить информацию о его высвобождении из НЧ в первые часы,

во всяком случае – в условиях эксперимента. Очевидно, при этом происходит два параллельных процесса – высвобождение доксорубина из НЧ и его диффузия через диализную мембрану. Второй процесс (насыщение мембраны доксорубином) оказывается скоростью лимитирующим фактором в первые часы процесса высвобождения [221].

Таким образом, были разработаны и оптимизированы методы изучения кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ в модельные среды *in vitro*. Оптимальным методом отделения НЧ в данном случае является центрифугирование с ускорением  $48254 \times g$  (+5 °С, 30 мин), а наиболее подходящей модельной средой – 1 % водный раствор полоксамера 188.

### 3.2.2. Изучение влияния pH среды на профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ

Одним из факторов, влияющим на профиль высвобождения ЛВ из НЧ *in vitro* является pH среды высвобождения. Известно, что одной из отличительных особенностей опухолевых тканей, является более высокая по сравнению с нормальными тканями кислотность внеклеточной среды (pH=6,2-6,8), которая способствует инвазии опухоли и метастазированию, а также устойчивости к химиотерапии [234-239]. При этом, сравнение кислотности среды в мембранных органеллах и цитозоле устойчивых к химиотерапевтическим агентам и чувствительных линий опухолевых клеток показало, что для резистентных линий характерны более низкие значения pH среды внутри мембранных органелл и более высокие значения pH цитозоля [240]. В связи с этим, для изучения кинетики высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ в среде, имитирующей внеклеточное пространство опухолевых клеток, использовали MES буфер (0,1 моль/л, pH=6,5). MES является одним из наиболее широко используемых биологических буферов; собой цвиттер-ионную N-замещенную аминосульфоновую кислоту с морфолиновым кольцом (pKa = 6,15). Известно также, что эндоцитоз играет важную роль в процессе доставки ЛВ, связанных с НЧ в опухолевые клетки [241]. Кроме того, поскольку интернализация НЧ размером 100-200 нм в эукариотические клетки происходит в основном посредством клатрин-зависимого эндоцитоза [242; 243], для которого характерно последующее слияние эндоцитозных пузырьков с лизосомами (pH  $\approx$  4,5), профиль высвобождения доксорубина из НЧ исследовали в натрий-ацетатном буферном растворе (0,1 моль/л, pH=4,5). Профили высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в буферных растворах с различным pH, в сравнении с профилем высвобождения в 1 % растворе полоксамера 188, представлены на рисунке 28.

На рисунке 28 видно, что в кислой среде скорость высвобождения доксорубина из НЧ выше: в случае PLGA-Dox/7,4 при pH 6,5 через 6 ч высвобождается 43 % доксорубина, при

pH 4,5 – 94 %, в то время как в 1 % растворе полуксамера высвобождается всего 23 % доксорубина.

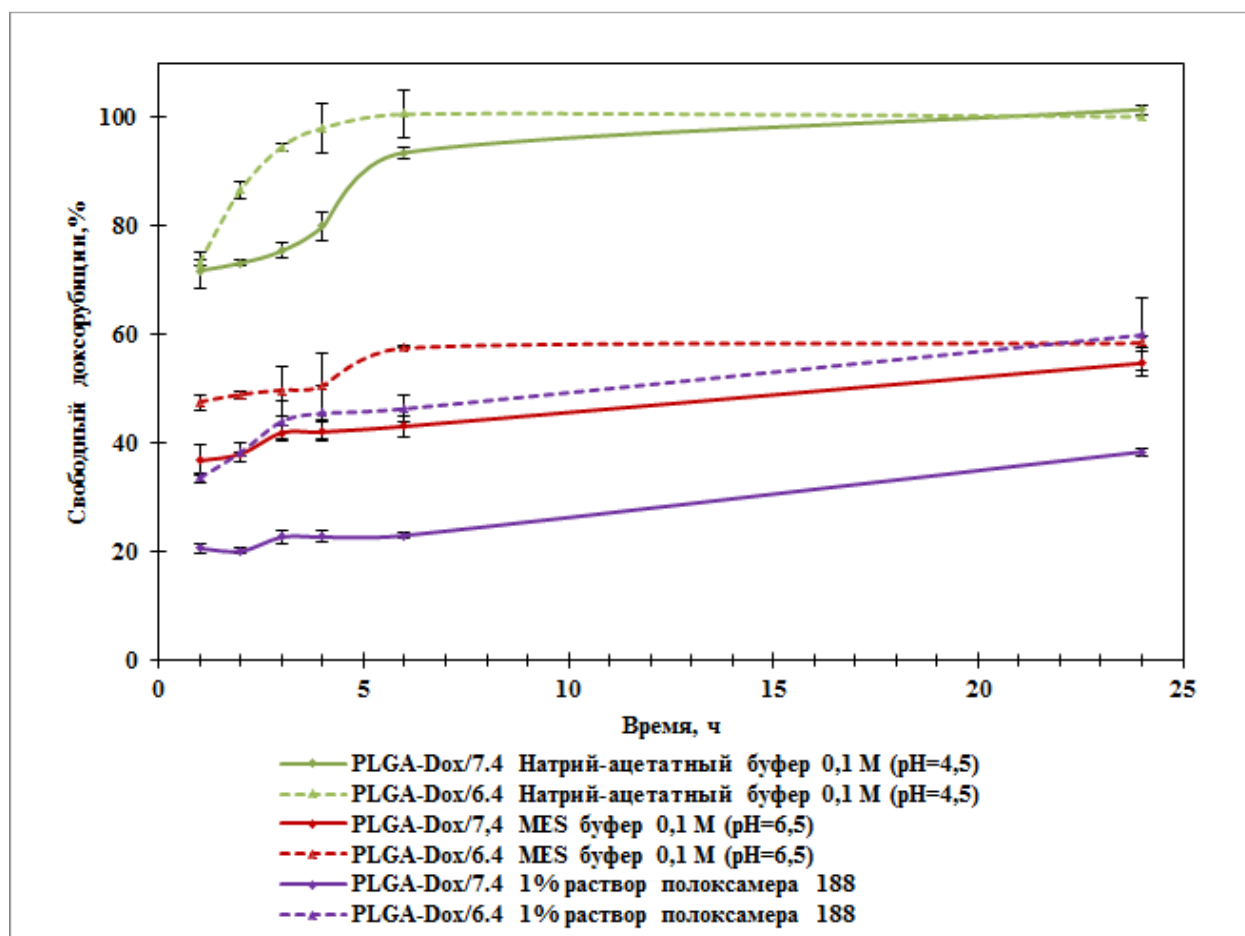


Рисунок 28 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в натрий-ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH=4,5), MES буфере (0,1 моль/л, pH=6,5) и 1 % растворе полуксамера 188; температура инкубации +37 °C; разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$ ; n=3

Стоит отметить, что чем ниже pH среды высвобождения, тем меньше разница в профиле высвобождения для НЧ с разной степенью включения. Так, через 6 ч инкубации в 1 % растворе полуксамера 188 разница в количестве высвобожденного доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 составила 23 %, в MES буфере при pH=6,5 – 15 %, в натрий-ацетатном буфере при pH=4,5 – всего 7 %. Данную закономерность можно объяснить повышением растворимости малорастворимого в воде фосфата доксорубина, который включен в гидрофобную матрицу PLGA НЧ, в кислой среде в результате образования гидрохлорида. Высокая скорость высвобождения доксорубина из НЧ в средах с кислым pH продемонстрирована в работах других авторов [242].

### 3.2.3. Изучение подходов к математическому описанию кинетики высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ

Моделирование кинетики высвобождения ЛВ из НЧ позволяет определить механизм высвобождения и спрогнозировать влияние состава полимерной матрицы на кинетику высвобождения ЛВ. Для описания кинетики высвобождения лекарственных веществ из полимерной матрицы и сравнения параметров высвобождения могут быть применены различные математические модели, в том числе модели нулевого и первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла, Корсмейера-Пеппаса, и др. [244-249]. Каждая из этих моделей имеет свои особенности, обуславливающие применимость к конкретному типу носителя ЛВ. Уравнение нулевого порядка объясняет поведение систем, в которых скорость высвобождения ЛВ не зависит от его концентрации [250]. Модель первого порядка применима в тех случаях, когда скорость высвобождения ЛВ из систем зависит от его концентрации [251]. Уравнение Хигучи описывает высвобождение ЛВ из нерастворимого матрикса и не распространяется на набухающую полимерную систему [246]. Модель Хиксона-Кроуэлла описывает случаи, когда матрица подвергается биодеструкции, например, гидролитической или ферментативной [252]. Полуэмпирическую экспоненциальную модель Корсмейера-Пеппаса также часто используют для описания высвобождения ЛВ из гидрофильной полимерной матрицы [253].

Средние кинетические параметры высвобождения доксорубицина *in vitro* из наночастиц PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в 1 % растворе полоксамера 188 были рассчитаны с использованием моделей нулевого и первого порядка, а также моделей Хигучи, Хиксона-Кроуэлла и Модели Корсмейера-Пеппаса. В таблице 27 представлены параметры профилей для 3 моделей, наиболее адекватно описывающих кинетику высвобождения доксорубицина. Поскольку, как было отмечено выше, высвобождение доксорубицина из PLGA-Dox НЧ имеет двухфазный характер, математическое описание кинетики проводили для полной кривой (120 ч), а также отдельно для участка, характеризующего «burst-effect» (первые 6 ч), и участка, описывающего продолжительное высвобождение (6-120 ч). Также сравнивали кинетические параметры профилей высвобождения доксорубицина из отмытых – PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/6,4(G-25), и неотмытых НЧ (таблица 28) в течение 48 ч.

Как продемонстрировано в таблице 27, кинетику высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ адекватно описывает уравнение первого порядка, причем при анализе целой кривой (1–120 ч) скорость высвобождения для PLGA-Dox/6,4 выше, чем для PLGA-Dox/7,4. Различия между группами в первой фазе высвобождения («burst-effect») наиболее существенны при расчете по экспоненциальной модели Корсмейера-Пеппаса, которую часто используют для описания кинетики высвобождения ЛВ из биодеградируемой гидрофильной матрицы полимера

в первую фазу (60% от  $M_{\infty}$ ). Значение показателя диффузии ( $n$ ) в уравнении определяет модель высвобождения ЛВ: для сферических частиц значение  $n < 0,43$  указывает на высвобождение в соответствии с законом Фика;  $0,43 < n < 0,85$  соответствует аномальному транспорту, а  $n > 0,85$  – случаю диффузии II (нефиковская диффузия) [247]. Исходя из значений степени  $n$ , полученных для наших кривых, можно сделать вывод, что кинетика высвобождения доксорубина в основном подчиняется II закону диффузии Фика.

Таблица 27 – Математическое описание профилей высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в 1 % растворе полоксамера 188,  $n=3$  [254]

Время, ч	Модель						
	Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		1-го порядка	
	K	N	R <sup>2</sup>	K	R <sup>2</sup>	K	R <sup>2</sup>
<b>PLGA-Dox/7,4*</b>							
1-6	0,1792	<b>0,1745</b>	0,9199	0,0463	0,9504	--0,0172	0,9599
	± 0,0367	± 0,0320	± 0,0361	± 0,0041	± 0,0148	± 0,0024	± 0,0323
6-120	0,1264	<b>0,3740</b>	0,9698	0,0586	0,9536	--0,0095	0,9348
	± 0,0255	± 0,0312	± 0,0109	± 0,0089	± 0,0355	± 0,0030	± 0,0672
1-120	0,1581	<b>0,3115</b>	0,9584	0,0629	0,9576	--0,0112	0,9713
	± 0,0311	± 0,0285	± 0,002	± 0,0129	± 0,0311	± 0,0019	± 0,0395
<b>PLGA-Dox/6,4*</b>							
1-6	0,3614	<b>0,0521</b>	0,8603	0,0251	0,9055	--0,0113	0,9697
	± 0,0057	± 0,0078	± 0,0229	± 0,0035	± 0,0017	± 0,0008	± 0,0392
6-120	0,2360	<b>0,3167</b>	0,9671	0,0683	0,9083	--0,0336	0,9995
	± 0,0243	± 0,0143	± 0,0543	± 0,0054	± 0,0134	± 0,0021	± 0,0143
1-120	0,3009	<b>0,2459</b>	0,9293	0,0717	0,9539	--0,0332	0,9991
	± 0,0214	± 0,0134	± 0,0321	± 0,0021	± 0,0365	± 0,0043	± 0,0543

K – константа скорости;  $n$  – диффузионный коэффициент в уравнении Корсмейера-Пеппаса; R<sup>2</sup> – коэффициент корреляции.

В течение первых 6 ч для PLGA-Dox/7,4 коэффициент диффузии  $n$  составил  $0,1745 \pm 0,0320$ , а для PLGA-Dox/6,4 –  $0,0521 \pm 0,0078$  ( $p < 0,05$ ), что может косвенно свидетельствовать о том, что во втором случае доксорубин в меньшей степени находится в матрице НЧ, а расположен ближе к их поверхности и быстрее диффундирует в окружающую среду. Константа скорости в случае PLGA-Dox/6,4 выше в 2 раза, чем для PLGA-Dox/7,4

( $0,3614 \pm 0,0057$  и  $0,1792 \pm 0,0367$  соответственно,  $p < 0,05$ ), что можно объяснить градиентом между приемной средой и поверхностью НЧ, с которой десорбируется доксорубин. Этот градиент выше при более низкой степени включения доксорубина в матрицу НЧ (PLGA-Dox/6,4). При анализе полных кривых (1-120 ч) также только при обсчете по модели Корсмейера-Пеппаса удалось выявить статистические различия между профилем высвобождения доксорубина из НЧ, полученных при различных значениях pH (таблица 27).

Таблица 28 – Математическое описание и сравнение профилей (1-48 ч) высвобождения доксорубина из неотмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ и отмытых – PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/6,4(G-25); \* - репрезентативные данные

Модель										
Корсмейера-Пеппаса			Хигучи		1-го порядка		0-порядка		Хиксона-Кроуэлла	
К	N	R <sup>2</sup>	К	R <sup>2</sup>	К	R <sup>2</sup>	К	R <sup>2</sup>	К	R <sup>2</sup>
<b>PLGA-Dox/7,4*</b>										
0,1629	<b>0,3152</b>	0,9030	0,0763	0,9699	-0,0173	0,9906	0,0096	<b>0,9953</b>	-0,0047	0,9944
<b>PLGA-Dox/7,4(G-25)*</b>										
0,0709	<b>0,6047</b>	0,9609	0,1208	0,9912	-0,0296	<b>0,9983</b>	0,0149	0,9775	-0,0077	0,9970
<b>PLGA-Dox/6,4*</b>										
0,3424	<b>0,1865</b>	0,8726	0,0699	0,9509	-0,0243	0,9643	0,0089	<b>0,9930</b>	-0,0057	0,9772
<b>PLGA-Dox/6,4(G-25)*</b>										
0,1970	<b>0,3370</b>	0,8315	0,1044	0,9575	-0,0309	<b>0,9906</b>	0,0130	0,9533	-0,0076	0,9822

К – константа скорости; n – диффузионный коэффициент в уравнении Корсмейера-Пеппаса; R<sup>2</sup> – коэффициент корреляции.

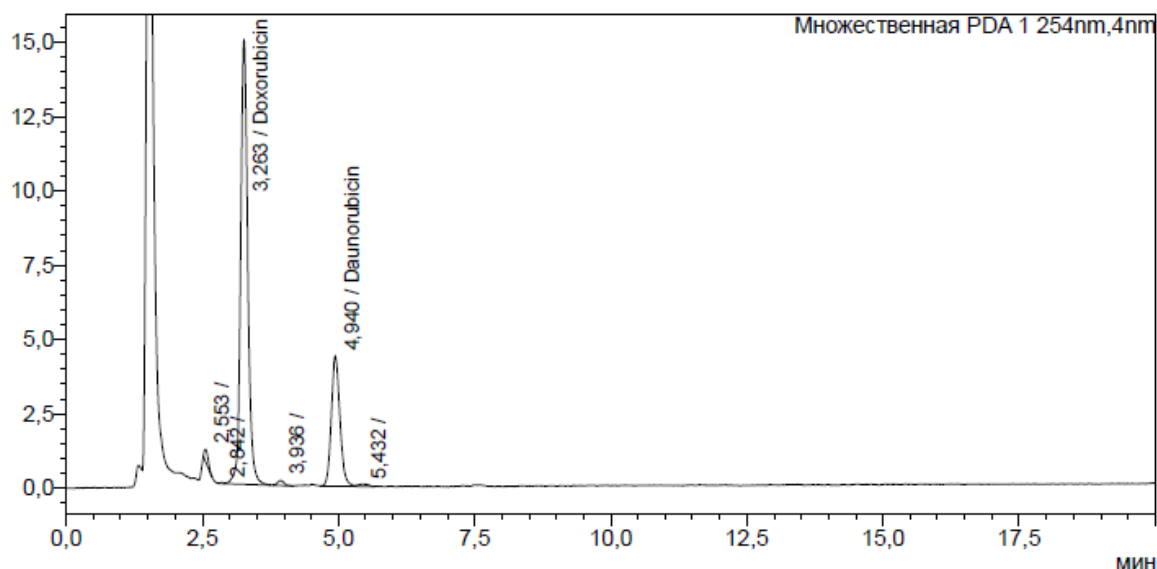
После отделения свободной фракции доксорубина (отмытые НЧ) коэффициент «n» в уравнении Корсмейера-Пеппаса значительно увеличивается (таблица 28). Показатель "n" отражает вклад процессов диффузии и десорбции в кинетику высвобождения: то есть увеличение "n" указывает на возрастающую роль диффузии. Следовательно, более высокое значение «n» предполагает, что в матрицу включена большая доля ЛВ.

Для сравнения, модель 3RPT точно соответствует кривым высвобождения, не давая убедительного объяснения зависящих от времени изменений скорости высвобождения, которые моделируются с использованием трех параметров m, b и c. Тем не менее, применение данной модели в контроле качества твердых лекарственных форм и в большом количестве биорелевантных исследований свидетельствует о том, что модель отражает широкий спектр вариантов поведения ЛВ при высвобождении, что обязательно способствует «беспристрастности» моделирования.

### 3.3. Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ в плазме человека

В соответствии с рекомендациями FDA и ЕМА для лекарственных средств, содержащих наноматериалы, предназначенных для внутривенного введения (в том числе липосомальных лекарственных форм), при проведении фармакокинетических исследований необходимо определение общего, свободного и связанного с носителем ЛВ в плазме крови [158; 189]. В литературе описаны различные методы отделения свободного доксорубина от носителя (липосом, НЧ) в плазме: твердофазная экстракция [255], жидкостная экстракция [256], ультрафильтрация [257], капиллярный электрофорез [258] и др.

Для изучения профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ в плазме (+37 °С) была разработана методика количественного определения свободного и общего доксорубина в плазме крови методом ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Результаты исследований описаны в [259]. При оптимизации метода проводили определение содержания свободного доксорубина (%) в плазме в диапазоне общего содержания доксорубина от 10 до 100 мкг/мл для двух типов НЧ – PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4, при этом использовали разные режимы центрифугирования для отделения НЧ (15000 × g / 48254 × g, + 4° С, 30 мин) и разные варианты экстракции (100 % АЦН + 0,1 % МК / смесь АЦН:ДМСО (1:1)), как описано в разделе 2.5.2. Типичная хроматограмма испытуемого раствора при определении общего доксорубина в плазме после экстракции с использованием смеси АЦН:ДМСО (1:1) приведена на рисунке 29.



PDA Ch1 254nm

Пик No.	Вр. удерж.	Имя	Площадь	S/N	Высота
1	2,553		1825	15,29	394
2	2,842		182	1,35	35
3	3,263	Doxorubicin	135474	582,77	14996
4	3,936		1359	6,75	174
5	4,940	Daunorubicin	48146	169,95	4373
6	5,432		1021	2,83	73
Сумма			188008		20044

Рисунок 29 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора при определении общего доксорубицина в плазме в концентрации 50 мкг/мл; время удерживания доксорубицина – 3,263 мин, даунорубицина (BC) – 4,940 мин

На основании полученных данных можно заключить, что экстракция с использованием только АЦН (без ДМСО) в качестве экстрагента не обеспечивает полного разрушения PLGA-Dox НЧ, что приводит к недостаточному извлечению общего доксорубицина поскольку НЧ и занижению его содержания в плазме. Добавление ДМСО в соотношении 1:1 значительно увеличивает эффективность экстракции доксорубицина: для PLGA-Dox НЧ с 83-93% до 97-102% в зависимости от концентрации наночастиц (таблица 29). Следует отметить, что с увеличением концентрации НЧ степень экстракции снижалась при использовании обоих типов экстрагентов. Так, при использовании смеси ацетонитрила и ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % муравьиной кислоты в качестве экстрагента процент экстракции общего доксорубицина варьировал от  $97,16 \pm 2,89$  % до  $101,90 \pm 0,30$  % для 100 мкг/мл и 10 мкг/мл доксорубицина в плазме, соответственно.

Таблица 29 – Влияние экстрагента на степень извлечения общего доксорубина из плазмы; значения приведены для PLGA-Dox/7,4 НЧ; доверительный интервал для n=3, P=0,95

Общая концентрация доксорубина в плазме (номинальная), мкг/мл	Экстрагент (+ 0,1 % МК)	Общая концентрация доксорубина в плазме (практическая), мкг/мл	Степень экстракции общего доксорубина, %
<b>10</b>	АЦН	<b>9,26±0,02</b> [9,24;9,28]	<b>92,60±0,18</b> [92,40;92,80]
	АЦН + ДМСО (1:1)	<b>10,19±0,03</b> [10,16;10,22]	<b>101,90±0,30</b> [101,56;102,9]
<b>50</b>	АЦН	<b>43,53±1,32</b> [42,04;45,02]	<b>87,06±2,64</b> [84,07;90,05]
	АЦН + ДМСО (1:1)	<b>49,65±0,64</b> [48,93;50,37]	<b>99,30±1,28</b> [97,85;100,30]
<b>100</b>	АЦН	<b>82,81±0,65</b> [82,08;83,55]	<b>82,81±0,65</b> [82,08;83,55]
	АЦН + ДМСО (1:1)	<b>97,16±2,89</b> [93,89;100,43]	<b>97,16±2,89</b> [93,89;98,16]

Подобно результатам, полученным при исследовании влияния режима центрифугирования на содержание (%) свободного доксорубина в модельных средах, центрифугирование с ускорением  $15000 \times g$  приводит к завышению содержания свободного доксорубина в супернатанте в среднем на 10 % за счет недоосаждения НЧ, по сравнению с центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$  (рисунок 30). В связи с этим при изучении профиля высвобождения доксорубина из НЧ в плазме, НЧ отделяли при большем ускорении ( $48254 \times g$ ).

Кроме того, было изучено влияние начальной концентрации НЧ в плазме на содержание (%) доксорубина в супернатанте; для PLGA-Dox/6,4 характерна большая величина «burst-effect» по сравнению с PLGA-Dox/7,4, при этом фракция высвободившегося доксорубина растет от  $55,39 \pm 1,78$  % до  $82,82 \pm 1,48$  % с уменьшением начальной концентрации НЧ от 100 до 10 мкг/мл по доксорубину. В то же время влияние разведения на PLGA-Dox/7,4 НЧ не столь существенно: содержание свободного доксорубина в плазме увеличилось с  $48,28 \pm 0,48$  % до  $63,05 \pm 1,33$  % в изученном диапазоне разведения НЧ.

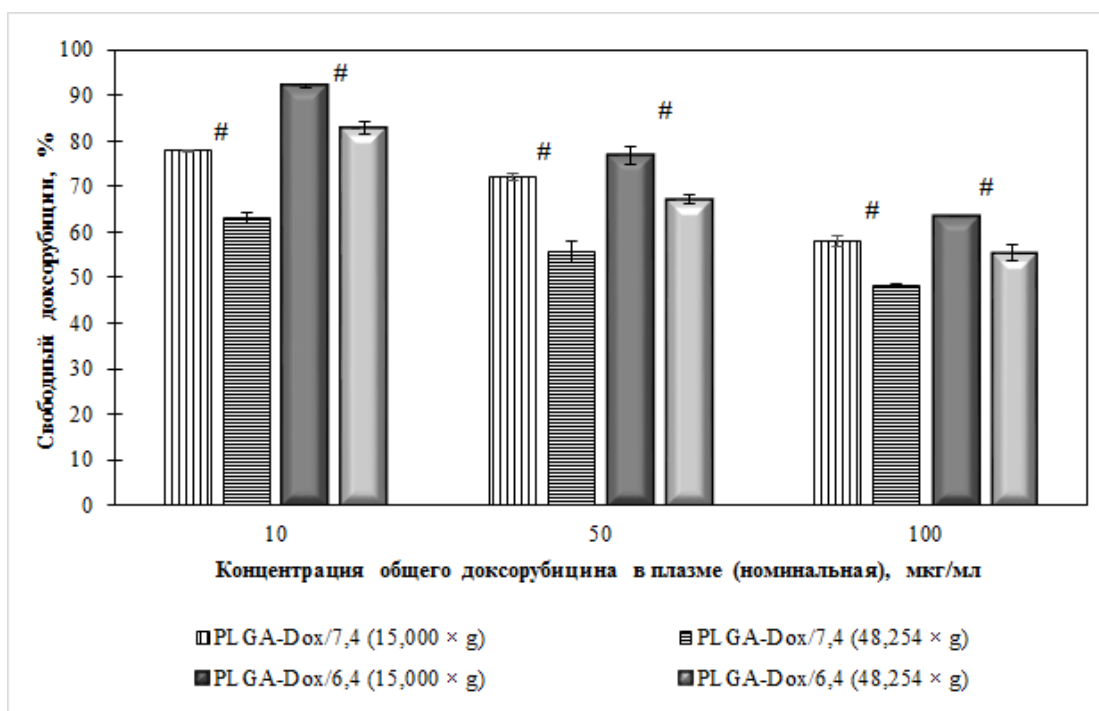


Рисунок 30 – Влияние режима центрифугирования на содержание свободного доксорубина в плазме крови для PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4; сравнение режимов центрифугирования (15000 × g / 48 254 × g); экстракция смесью АЦН:ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % МК; n = 3.

Адаптировано из [259]

Что касается влияния типа экстрагента на содержание свободного доксорубина (%) в плазме, при отделении НЧ в условиях низкого ускорения (15000 × g) добавление ДМСО не оказывает влияния на процентное содержание свободного доксорубина в супернатанте, поскольку в результате него увеличивается одновременно экстракция и общего доксорубина и доксорубина из недоосажденных НЧ в супернатанте (таблица 30). При более высоком ускорении (48 254 × g) происходит более полное осаждение НЧ, поэтому добавление ДМСО оказывает влияние в основном на содержание общего доксорубина (степень извлечения увеличивается на 10-14%); в результате наблюдалось небольшое, но статистически значимое снижение процентного содержания свободного доксорубина (2-3%).

Таблица 30 – Влияние экстрагента на содержание (%) свободного доксорубина в плазме; значения приведены для PLGA-Dox/7,4 НЧ; доверительный интервал для n=3, P=0,95

Общая концентрация доксорубина в плазме (номинальная), мкг/мл	Режим центрифугирования	Экстрагент (+ 0,1 % МК)	Концентрация свободного доксорубина в плазме (практическая), мкг/мл	Содержание свободного доксорубина, %
<b>10</b>	15000 × g	АЦН	<b>7,08±0,00</b> [7,08;7,08]	<b>76,46±0,03</b> [76,42;76,49]
		АЦН + ДМСО (1:1)	<b>7,93±0,00</b> [7,93;7,93]	<b>77,82±0,00</b> [77,82;77,82]
	48254 × g	АЦН	<b>6,02±0,09</b> [5,92;6,12]	<b>65,01±0,97</b> [63,91;66,11]
		АЦН + ДМСО (1:1)	<b>6,43±0,14</b> [6,27;6,59]	<b>63,10±1,37</b> [61,55;65,66]
<b>50</b>	15000 × g	АЦН	<b>30,03±0,01</b> [30,02;30,03]	<b>68,99±0,02</b> [68,96;69,01]
		АЦН + ДМСО (1:1)	<b>33,16±0,42</b> [32,68;33,64]	<b>66,79±0,85</b> [65,83;67,74]
	48254 × g	АЦН	<b>24,87±0,63</b> [24,16;25,58]	<b>57,13±1,45</b> [55,50;58,77]
		АЦН + ДМСО (1:1)	<b>27,58±1,14</b> [26,29;2,87]	<b>55,55±2,30</b> [52,95;58,15]
<b>100</b>	15000 × g	АЦН	<b>48,55±1,21</b> [47,18;48,55]	<b>58,63±1,46</b> [56,97;60,28]
		АЦН + ДМСО (1:1)	<b>56,39±1,05</b> [55,20;57,58]	<b>58,04±1,08</b> [56,82;59,26]
	48254 × g	АЦН	<b>41,66±0,97</b> [40,56;42,76]	<b>50,31±1,17</b> [48,98;51,63]
		АЦН+ДМСО 1:1	<b>46,91±0,46</b> [46,39;47,43]	<b>48,28±0,47</b> [47,75;48,82]

Таким образом, при изучении высвобождения доксорубина в плазме человека смесь ацетонитрила и ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % МК значительно улучшает экстракцию доксорубина, в то время как оптимальное разделение свободной и связанной с НЧ фракций достигается при ускорении 48254 × g. Данные условия были использованы для изучения профиля высвобождения доксорубина в плазме *in vitro* (рисунок 31) и в экспериментах *in vivo* (раздел 3.1). Следует отметить, что в модельной среде (1 % раствор полоксамера 188;

разведение 1:25) содержание свободного доксорубина для PLGA-Dox/6,4 в течение первых 6 ч инкубации было на  $\approx 20\%$  выше, чем для PLGA-Dox/7,4, в то время как в плазме эти различия составляют не более  $10\%$ . Таким образом, степень высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ в плазме в целом выше, чем в модельных средах. Возможно, высокие значения содержания свободного доксорубина в плазме связаны с недостаточным осаждением НЧ на выбранной скорости центрифугирования в связи с высокой вязкостью плазмы при  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ . Вязкость плазмы приблизительно в 2 раза превышает вязкость исследуемых ранее модельных сред: при снижении температуры от  $+37\text{ }^\circ\text{C}$  до  $+5\text{ }^\circ\text{C}$  динамическая вязкость повышается с 1,7 до 3,2 мПа $\times$ с (на  $48\%$ ), в то время как вязкость воды в соответствующих условиях повышается с 0,7 до 1,5 мПа $\times$ с [260]. В связи с этим для отделения НЧ от свободного доксорубина в плазме необходимо использовать возможно большую скорость центрифугирования.

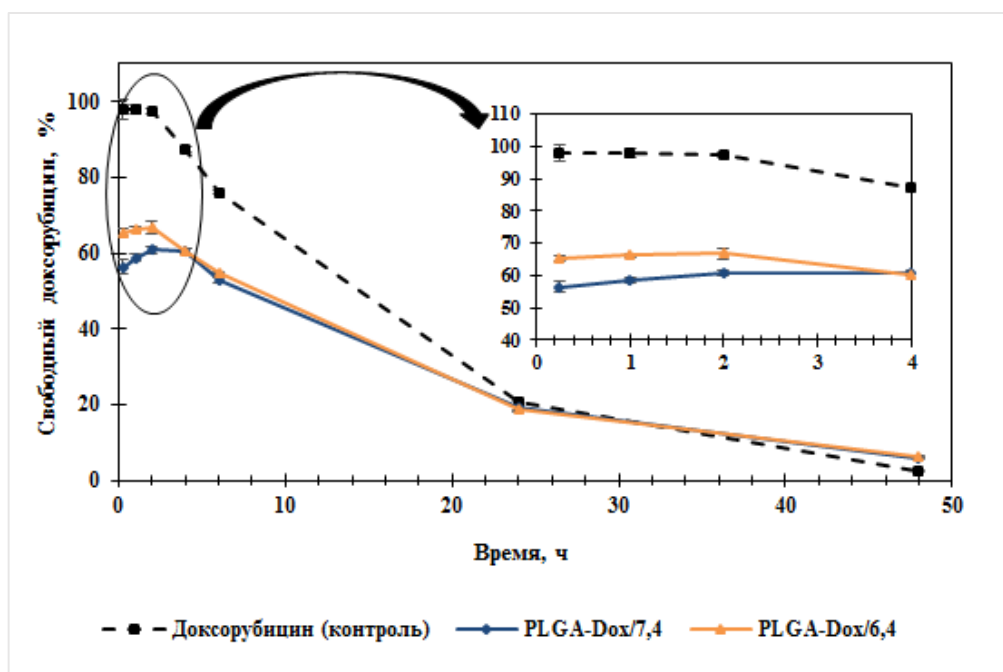


Рисунок 31 – Кинетика высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в плазме (контроль – субстанция доксорубина);  $n=3$ . Адаптировано из [259]

Стабильность доксорубина в плазме крови ограничена [261]; следовательно, только более ранние моменты времени могут достоверно отражать процесс высвобождения. В рамках настоящего эксперимента изучение кинетики высвобождения доксорубина в плазме крови (концентрация доксорубина  $\approx 70$  мкг/мл) ограничено низкой стабильностью в условиях эксперимента (4 ч при  $+37\text{ }^\circ\text{C}$ ). Дополнительно, чтобы в дальнейшем оптимизировать и упростить процедуру анализа доксорубина в плазме, исследовали стабильность суспензий PLGA-Dox/7,4 НЧ в плазме во время процедуры замораживания-оттаивания. При этом к

плазме добавляли аликвоту 10-кратной суспензии НЧ (концентрация доксорубицина – 500 мкг/мл), в результате чего номинальная концентрация доксорубицина в плазме до замораживания составляла 50 мкг/мл. После замораживания образцов плазмы в течение 3 суток при  $-70^{\circ}\text{C}$  и оттаивания при комнатной температуре содержание свободного доксорубицина (%) увеличилось с  $54,01 \pm 0,43\%$  до  $57,06 \pm 1,05\%$  ( $n=3$ ,  $p < 0,05$ ), при этом содержание общего доксорубицина не изменилось. Следовательно, отобранные в процессе исследования кинетики высвобождения *in vitro* образцы плазмы могут быть заморожены при  $-70^{\circ}\text{C}$ , а затем разморожены непосредственно перед пробоподготовкой к анализу ВЭЖХ; при этом можно предположить аналитическую ошибку приблизительно 3% в количественном определении свободного доксорубицина (%).

### **3.4. Изучение факторов, влияющих на профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Дох НЧ**

Хотя исследование профиля высвобождения ЛВ из наночастиц является практически обязательным этапом разработки систем доставки ЛВ, а кинетические закономерности этого процесса достаточно хорошо изучены, практические работы по управлению профилем высвобождения того или иного ЛВ из НЧ ограничиваются в основном влиянием свойств полимерной матрицы. Эта область опирается на продолжающиеся уже несколько десятилетий исследования, направленные на разработку полилактидных депо-форм различных ЛВ (имплантатов и микросфер). Основным (но не единственным) фактором, определяющим длительность и профиль высвобождения ЛВ из депо-форм на основе полилактидов, является скорость (длительность и профиль) гидролиза полимерной матрицы ЛФ, которая в свою очередь в значительной степени зависит от молекулярной массы полилактида/полилактидов, их состава (соотношения звеньев молочной и гликолевой кислот в макромолекулах полилактидов), степени их кристалличности и некоторых других параметров. При прочих равных условиях чем выше молекулярная масса полилактида и чем выше степень его кристалличности – тем медленнее происходит гидролиз матрицы, и тем дольше высвобождается из него ЛВ [36; 262]. Если на первом этапе для быстрого достижения терапевтической концентрации ЛВ в крови необходимо обеспечить быструю подачу ЛВ (стадия «burst-release»), эту проблему также решают в том числе, изменяя состав полилактидной матрицы – например, путем введения в состав микросфер низкомолекулярных полилактидов [263; 264].

Однако для тех случаев, когда лекарственная форма представляет собой наночастицы, терапевтические или диагностические, речь не идет о длительном (от двух недель до полугода)

высвобождении ЛВ. Как было отмечено ранее, высвобождение ЛВ из НЧ на основе PLGA происходит в несколько этапов: вначале происходит десорбция ЛВ с поверхности НЧ в приемную среду («burst-effect»), затем ЛВ высвобождается за счет диффузии из полимерной матрицы, а в дальнейшем в результате ее деградации [265]. В этом случае крайне важными становятся такие процессы/факторы, как десорбция ЛВ с поверхности НЧ и диффузия его из-под приповерхностных слоев НЧ, а также сродство ЛВ к матрице НЧ – поскольку диффузия ЛВ сквозь полимерную матрицу, и тем более по порам в полимерной матрице, образовавшимся в результате гидролиза полилактида, определяют высвобождение ЛВ на значительно более поздних этапах. В то же время в ряде случаев именно скорость и интенсивность высвобождения ЛВ из НЧ в первые сутки или даже в первые часы может определять эффективность терапевтической или диагностической формы на основе полилактидных НЧ. В связи с этим на примере PLGA-Dox были изучены некоторые, отличные от существенного изменения полимерного состава НЧ, способы влияния на скорость высвобождения ЛВ из PLGA НЧ, а также на степень его включения в НЧ.

PLGA-Dox НЧ были получены методом «двойных эмульсий». Для получения НЧ с разной степенью включения и скоростью высвобождения доксорубина варьировали следующие параметры:

- кислотность внешней водной фазы двойной эмульсии (1 % ПВС в PBS) при получении НЧ (рН 6,4 или 7,4);
- наличие/отсутствие концевых карбоксильных групп в молекулах PLGA (Resomer<sup>®</sup> 502H, Resomer<sup>®</sup> 502S или их смесь);
- молекулярный вес PLGA (10-12 или 4-5 кДа, вязкость 0,2 и 0,18 дл/г, соответственно).

Для получения НЧ с медленным высвобождением доксорубина в НЧ включали гидрофобный комплекс доксорубина с диоктилсульфосукцинатом натрия (АОТ), либо использовали PLGA с высокой вязкостью (0,66 дл/г), при этом для повышения степени включения доксорубина в полимерную композицию вводили олигомер PLGA с молекулярной массой ~ 700-800 кДа с карбоксильными концевыми группами. Физико-химические параметры полученных форм (таблица 31) определяли с использованием оптимизированных методов, как описано ранее. В том числе, профиль высвобождения доксорубина изучали в 1 % растворе полоксамера 188 при температуре +37 °С; НЧ отделяли центрифугированием (48254 × g). В результате, были выявлены факторы, оказывающие влияние на степень включения доксорубина, и соответственно, величину «burst-effect», а также скорость дальнейшего высвобождения в результате диффузии из матрицы и ее деградации (гидролитическая деградация).

Таблица 31 – Физико-химические параметры наночастиц с разным профилем высвобождения доксорубицина (средние значения  $\pm$  sd); n=3

Характеристика полимера	pH	Активный ингредиент	Соотношение PLGA/Дох, мг/мг	Нагрузка, %	Степень включения, %	Свободный доксорубин (1 час), %	Средний размер, нм	PDI	$\zeta$ -потенциал, мВ
<b>Resomer® 502H</b>	7,4	Доксорубицина гидрохлорид	9,98 $\pm$ 0,27	9,1 $\pm$ 0,3	91,0 $\pm$ 0,7	20,4 $\pm$ 0,4	105 $\pm$ 12	0,144 $\pm$ 0,001	-10,5 $\pm$ 1,3
<b>Resomer® 502H</b>	6,4	Доксорубицина гидрохлорид	10,18 $\pm$ 0,17	7,8 $\pm$ 0,1	79,7 $\pm$ 1,1	37,5 $\pm$ 2,2	137 $\pm$ 7	0,301 $\pm$ 0,069	-6,9 $\pm$ 3,0
<b>Lactel® B6013-1G</b>	7,4	Доксорубицина гидрохлорид	12,88 $\pm$ 0,07	7,5 $\pm$ 0,1	96,7 $\pm$ 1,6	13,1 $\pm$ 4,0	89 $\pm$ 1	0,142 $\pm$ 0,025	-13,7 $\pm$ 0,3
<b>Смесь Resomer® 502H и 502S (1:1)</b>	7,4	Доксорубицина гидрохлорид	12,13 $\pm$ 0,11	5,3 $\pm$ 0,1	64,7 $\pm$ 0,5	49,2 $\pm$ 5,6	119 $\pm$ 2	0,180 $\pm$ 0,033	-4,5 $\pm$ 1,9
<b>Resomer® 502S</b>	7,4	Доксорубицина гидрохлорид	10,20 $\pm$ 0,21	4,0 $\pm$ 0,8	41,0 $\pm$ 2,7	65,6 $\pm$ 3,3	134 $\pm$ 1	0,165 $\pm$ 0,013	-3,7 $\pm$ 0,3
<b>Lactel® B6013-2P + олигомер 20:1, отмытые</b>	7,4	Доксорубицина гидрохлорид	21,60 $\pm$ 0,23	3,9 $\pm$ 0,8	83,9 $\pm$ 2,8	23,3 $\pm$ 0,8	122 $\pm$ 1	0,084 $\pm$ 0,027	-24,2 $\pm$ 1,4
<b>Resomer® 502H</b>	7,4	Доксорубицина гидрохлорид + АОТ	29,60 $\pm$ 0,03	2,9 $\pm$ 0,1	87,0 $\pm$ 0,8	20,3 $\pm$ 0,6	76 $\pm$ 1	0,140 $\pm$ 0,012	-17,0 $\pm$ 1,8

### 3.4.1. Влияние pH внешней водной фазы при получении PLGA-Dox НЧ методом двойных эмульсий

Как было отмечено выше, снижение pH внешней водной фазы эмульсии с 7,4 до 6,4 приводило к снижению степени включения доксорубицина в НЧ (91,0 % и 79,7 %, соответственно) и увеличению первоначального высвобождения доксорубицина из НЧ в модельную среду ~ на 17% (рисунок 26; центрифугирование). pH среды является фактором, влияющим на ионную форму доксорубицина и, соответственно, на эффективность связывания его молекул внутри и на поверхности матрицы. При снижении pH от нейтрального значения 7,4 до 6,4 происходит увеличение доли катионов с протонированной аминогруппой ( $pK_a=7,2-8,2$ ) и снижение доли цвиттер-ионов ( $pK_a$  аниона=9,5) и основания доксорубицина, что приводит к повышению его растворимости в воде и снижению растворимости в неполярных органических растворителях. Повышение растворимости снижает сродство доксорубицина к гидрофобной полимерной матрице PLGA, то есть, соответственно, к снижению степени включения. При этом увеличение «burst-effect» позволяет предположить, что в этом случае доксорубицина в основном находится вблизи поверхности НЧ, слабее с ней связан и быстрее высвобождается.

Таким образом, понижение pH внешней водной фазы эмульсии – фосфатно-солевого буфера – с 7,4 до 6,4 приводит к значимому понижению степени включения доксорубицина в НЧ. Следует отметить, что, тем не менее, и при pH 6,4 доксорубицин определенно входит в состав НЧ, что отражается на температуре плавления полилактида (таблица 32). Для НЧ, полученных как при pH 7,4, так и при pH 6,4 доксорубицин выступает в качестве антипластификатора, несколько повышая температуру стеклования полилактида по сравнению с температурой стеклования полилактида в составе аналогичных плацебо-НЧ.

Таблица 32 – Влияние доксорубицина на температуру стеклования Resomer®502H

Образец	Tg, °C
PLGA	42,0
Плацебо-PLGA	38,8
PLGA-Dox/7,4	42,8±0,3
PLGA-Dox/6,4	43,8±0,7

### 3.4.2. Влияние свойств полимера (молекулярный вес, вязкость, кислотное число, остаточное содержание мономера)

Уменьшение (или увеличение) молекулярной массы полимера сопровождается соответствующим увеличением (или уменьшением) количества концевых карбоксильных групп в матрице НЧ (при прочих равных условиях, то есть при близких диаметре и плотности НЧ), и соответственно, увеличением КЧ полимера. Поэтому в данном случае влияние на профиль высвобождения оказывают сразу два фактора: 1) изменение молекулярной массы PLGA, приводящие в свою очередь к изменению скорости диффузии доксорубина из НЧ и к изменению скорости гидролиза матрицы; и 2) количества концевых карбоксильных групп в PLGA, которые обуславливают возможность электростатического взаимодействия доксорубина – PLGA.

Для выяснения роли ключевых параметров полимера на профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ, для получения НЧ использовали два типа PLGA с концевыми карбоксильными группами с близкими значениями заявленной производителем логарифмической вязкости ( $\eta$ ): Resomer® 502H (0,2 дл/г) и Lactel® B6013-1G (0,18 дл/г). Данные полимеры были охарактеризованы в отношении характеристической вязкости, молекулярной массы (MW), КЧ и остаточного содержания мономера (таблица 33). Физико-химические параметры репрезентативных серий (\*) изученных типов НЧ представлены в таблице 34. Было выявлено, что сополимер Lactel® B6013-1G характеризуется более низкой характеристической вязкостью  $[\eta]$ , по сравнению с Resomer® 502H: 0,09 г/дл vs 0,13 г/дл, соответственно. Средневязкостная молекулярная масса, рассчитанная с использованием уравнения Марка – Хаувинка, также была существенно ниже: 7 кДа vs 11,7 кДа, соответственно. Аналогичная разница была обнаружена для значений средневесовых молекулярных масс, измеренных методом ГПХ: 4,7 кДа vs 10,3 кДа, соответственно. При этом низкая молекулярная масса коррелировала с низкой температурой стеклования  $T_g$  и большим значением кислотного числа (таблица 33). Кроме того, остаточное содержание мономера (водорастворимая фракция) в образце Lactel® B6013-1G было гораздо выше, чем для образца с большей молекулярной массой: 2,1 % vs 0,3 %, соответственно.

Таблица 33 – Сравнение параметров образцов полимера PLGA, указанных производителями и измеренных экспериментально. Адаптировано из [266]

Параметры	Resomer® 502H		Lactel® B6013-1G	
	Данные производителя	Полученные данные	Данные производителя	Полученные данные
Логарифмическое число вязкости, $\eta^{\#}$ , дл/г	0,2 (0,1 % раствор в хлороформе, +25 °С)	-	0,18 (0,5 % раствор в гексафторизо-пропанол, +30 °С)	-
Характеристическая вязкость $[\eta]^{\#\#}$ , дл/г	-	0,13±0,01	-	0,09±0,01
MW*, Да	7000-17000	10300±300	-	4700±300
Mv**, Да	-	11700	-	7100
Температура стеклования, °С	-	42,10±0,24	-	34,73±0,21
Кислотное число	9,9	11,8±0,9	-	21,4±0,3
Остаточное содержание мономера, вес/вес %	0,26	0,30±0,02	≤ 2,2	2,1±0,1

# Значения вязкости, предоставленные производителями, соответствуют значениям логарифмической вязкости, измеренным в данных условиях. Этот параметр зависит от концентрации раствора полимера;

## Значения характеристической вязкости были рассчитаны путем экстраполяции графика приведенной вязкости к нулевой концентрации с использованием 10%-ных растворов полимера в ТГФ при +22,5 °С;

\* Средневесовая молекулярная масса, измерена методом ГПХ;

\*\* Средневязкостная молекулярная масса, рассчитанная с использованием уравнения Марка – Хаувинка.

Таблица 34 – Физико-химические параметры PLGA-Dox НЧ, полученных на основе двух видов PLGA 50:50; репрезентативные данные (\*). Адаптировано из [266]

Параметры НЧ	Вид полимера	
	Resomer® 502H*	Lactel® B6013-1G*
Средний размер НЧ, нм	106 ± 8	83 ± 7
PDI	0,151 ± 0,008	0,136 ± 0,024
ζ-потенциал, мВ	-10,0 ± 0,8	-12,3 ± 1,1
Степень включения, %	91,5 ± 1,9	96,4 ± 1,3
Нагрузка, %	10,1 ± 1,8	8,0 ± 0,5

Таким образом, уменьшение молекулярной массы PLGA с 10,3 кДа до 4,7 кДа приводило к повышению степени включения доксорубина в НЧ (с 91,5 % до 96,4 %) за счет увеличения числа карбоксильных групп на единицу массы полимера, но в то же время значительно ускоряло диффузию доксорубина из матрицы НЧ. Так, в настоящем опыте, высвобождение доксорубина из НЧ, полученных из PLGA с молекулярной массой 10,3 кДа, через 1 час и 24 часа составило 21,3 % и 41,6 %, соответственно, в то время как для НЧ, полученных из PLGA с

молекулярной массой 4,7 кДа, через 1 и 24 часа высвободилось 16,7 % и 64,4 %, соответственно (рисунок 32). Полученные результаты согласуются с результатами предыдущих исследований. Так, увеличение молекулярной массы PLGA 50:50 с 14,5 до 45 кДа приводило к уменьшению скорости высвобождения эстрадиола, включенного в матрицу НЧ: 94,7 и 92,4% эстрадиола высвободилось через 18 и 33 дня, соответственно. Дальнейшее увеличение молекулярной массы до 85 кДа и 213 кДа привело к еще большему снижению скорости высвобождения: 54,5 и 26,6% первоначального количества эстрадиола высвободилось через 27 и 19 дней, соответственно [215]. Аналогичные наблюдения были сделаны для PLGA НЧ, нагруженных L-аспарагиназой: высвобождение фермента из НЧ на основе полимера с низкой молекулярной массой (12 кДа) и высокой молекулярной массой (30 кДа) составило 81,9 % и 46,3% через 14 дней, соответственно [267]. С учетом того, что полимеры с более низкой молекулярной массой также характеризуются меньшей вязкостью, это явление скорее всего объясняется более эффективной диффузией препарата в менее вязкой матрице во время контролируемой диффузией стадии высвобождения ЛВ. Соответственно, флурбипрофен быстрее высвобождается из НЧ, полученных на основе PLGA с характеристической вязкостью 0,32–0,44 дл/г по сравнению с НЧ, полученными на основе с большей вязкостью (0,7–1,1 дл/г) [268].

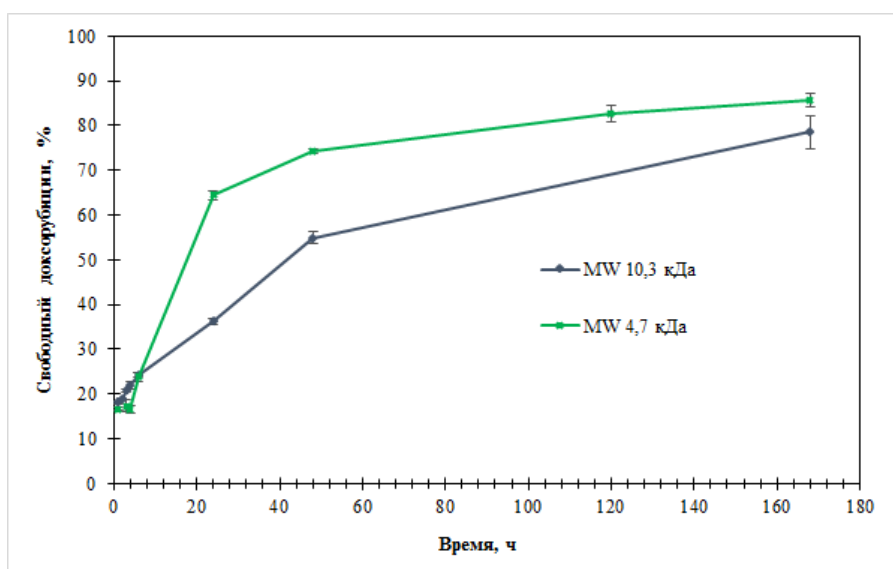


Рисунок 32 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 H (MW 10,3 кДа) и PLGA с низкой молекулярной массой Lactel® B6013-1G (MW 4,7 кДа); разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С); репрезентативные серии; n=3. Адаптировано из [266]

Молекулярная масса полимера является фактором, который влияет не только на скорость диффузии ЛВ внутри матрицы НЧ, но и на скорость гидролиза полимера. КЭФ –

альтернативный аналитический метод, основанный на анализе молочной кислоты, образующейся в результате полного гидролиза PLGA. Для данного метода характерна высокая скорость анализа, достаточная чувствительность и селективность; он может быть использован для исследования гидролиза PLGA как альтернатива методу ВЭЖХ [6]. Как продемонстрировано на рисунке 33, быстрое высвобождение водорастворимой фракции полимера в течение первых 6 ч, выраженной в % от содержания PLGA, полученного в результате гидролиза этой фракции, было характерно для обоих типов НЧ. Скорость высвобождения была значительно выше в случае НЧ, полученных на основе полимера с более низкой молекулярной массой, что можно, вероятно, объяснить более высоким содержанием низкомолекулярных олигомеров. По данным [269] верхний предел молекулярной массы водорастворимых олигомеров составляет 1000 Да.

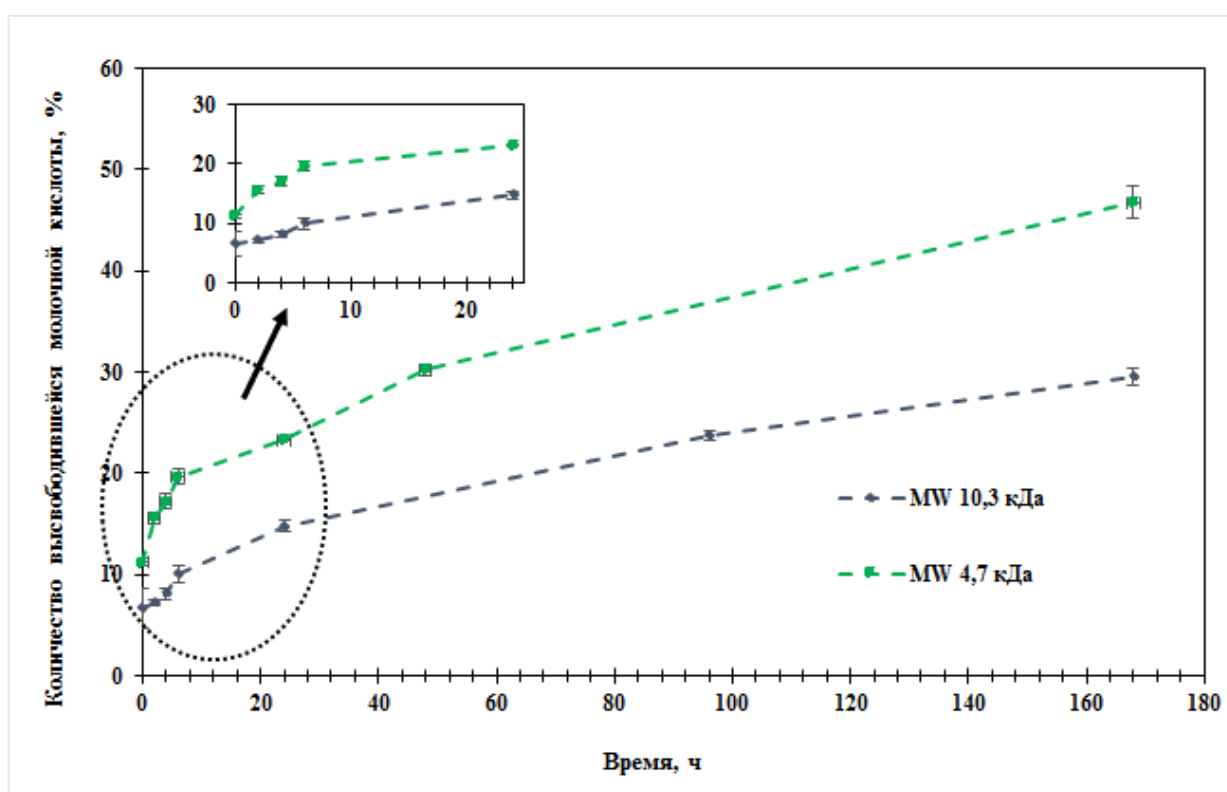


Рисунок 33 – Профиль гидролитической деградации PLGA-Dox НЧ на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 Н (MW 10,3 кДа) и PLGA с низкой молекулярной массой Lactel® B6013-1G (MW 4,7 кДа); среда – PBS (pH=7,4). Адаптировано из [266]

При этом можно наблюдать более высокую скорость гидролиза для НЧ, полученных из полимера с большей молекулярной массой. Эти данные коррелируют с результатами, полученными другими авторами, которые отмечали рост скорости гидролитической деградации

PLGA с уменьшением молекулярного веса полимера [270]. Более низкая молекулярная масса полимера облегчает диффузию олигомеров из полимерной матрицы к внешней водной фазе и противоточную диффузию молекул воды в матрице [271]. Более того, немного большее количество остаточного мономера в этом образце полимера (2,1%) также может способствовать более быстрому гидролизу за счет автокаталитического гидролиза PLGA, подобное явление также было продемонстрировано другими авторами [272].

Как упоминалось выше, высвобождение ЛВ из PLGA НЧ начинается с фазы быстрой диффузии НЧ с поверхности или приповерхностного слоя НЧ («burst-release») с последующей более медленной диффузией внутри полимерного матрикса, а в более поздние сроки опосредуется ее эрозией и деградацией [272]. Можно предположить, что в течение первых 6 ч гидролиз ядра PLGA не оказывает большого влияния на высвобождение ЛВ из НЧ. Однако по прошествии этого времени более высокая скорость высвобождения доксорубина из PLGA-Дох НЧ на основе полимера с меньшей вязкостью (4,7 кДа) коррелирует с более высокой скоростью гидролиза: количество водорастворимой фракции в суспензии данных НЧ растет быстрее, чем с суспензии НЧ, полученных на основе PLGA с вязкостью 10,3 кДа. Это наблюдение коррелирует с результатами других авторов, которые обнаружили, что скорость диффузии ЛВ через матрицу PLGA увеличивается с уменьшением молекулярного веса полимера: диффузия протекает эффективнее, когда полимерная матрица состоит из более коротких полимерных цепей [273; 274]. Соответственно, большей скорости высвобождения доксорубина НЧ на основе полимера с меньшей молекулярной массой способствует более эффективная диффузия ЛВ через полимерную матрицу, состоящую из более коротких полимерных цепей, а также более высокая скорость разложения этих НЧ по сравнению с НЧ полученными на основе полимера с большей вязкостью.

#### 3.4.3. Влияние изменения состава полилактидной матрицы наночастиц

Электростатическое взаимодействие между аминогруппой доксорубина и карбоксильными группами на поверхности PLGA НЧ оказывает существенное влияние на эффективность связывания (нагрузки, %) доксорубина наночастицами. Для оценки вклада этого взаимодействия в полимерную матрицу НЧ на основе Resomer® 502H, то есть на основе полилактида с концевыми карбоксильными группами, ввели аналогичный полилактид Resomer® 502S, в макромолекулах которого отсутствуют способные к диссоциации (карбоксильные) группы. Для изучения влияния наличия свободных карбоксильных групп PLGA были получены НЧ из Resomer® 502S, Resomer® 502H и смеси данных полимеров (1:1). Показано, что полное отсутствие концевых карбоксильных групп в полимерной композиции

приводило к снижению степени включения доксорубицина в НЧ до 41 % (рисунок 34).

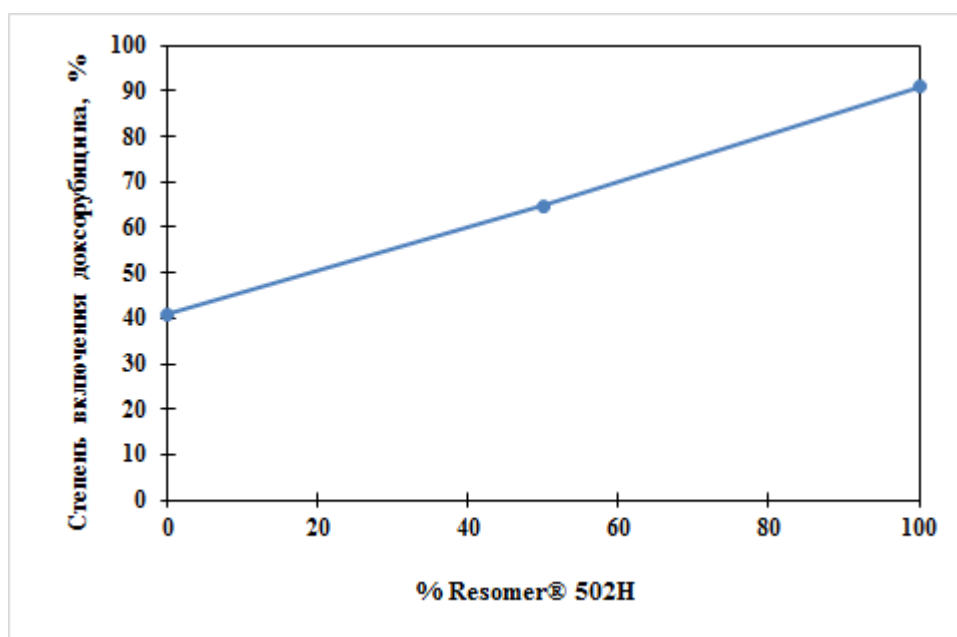


Рисунок 34 – Влияние содержания PLGA с концевыми кислотными группами в композиции на степень включения доксорубицина в НЧ

В то же время увеличение доли PLGA с карбоксильными концевыми группами в полимерной композиции приводило к повышению степени включения доксорубицина в НЧ и уменьшению первоначального высвобождения доксорубицина («burst-release»). Наличие карбоксильных групп в полилактиде обеспечивает электростатическое связывание доксорубицина с наночастицами и вносит существенный вклад в величину общей нагрузки наночастиц доксорубицином. Отсутствие карбоксильных групп в полилактиде приводит к тому, что при разбавлении большая часть (около 65%) доксорубицина сразу оказывается в приемной среде, и в ближайшие трое суток концентрация свободного доксорубицина в суспензии практически не изменяется. Введение в полимерный состав матрицы наночастиц сополимера PLGA с концевыми карбоксильными группами приводит к уменьшению величины burst-эффекта до 50% в первый же час после начала процесса и до 20% при полной замене Resomer® 502S на Resomer® 502H (рисунок 35).

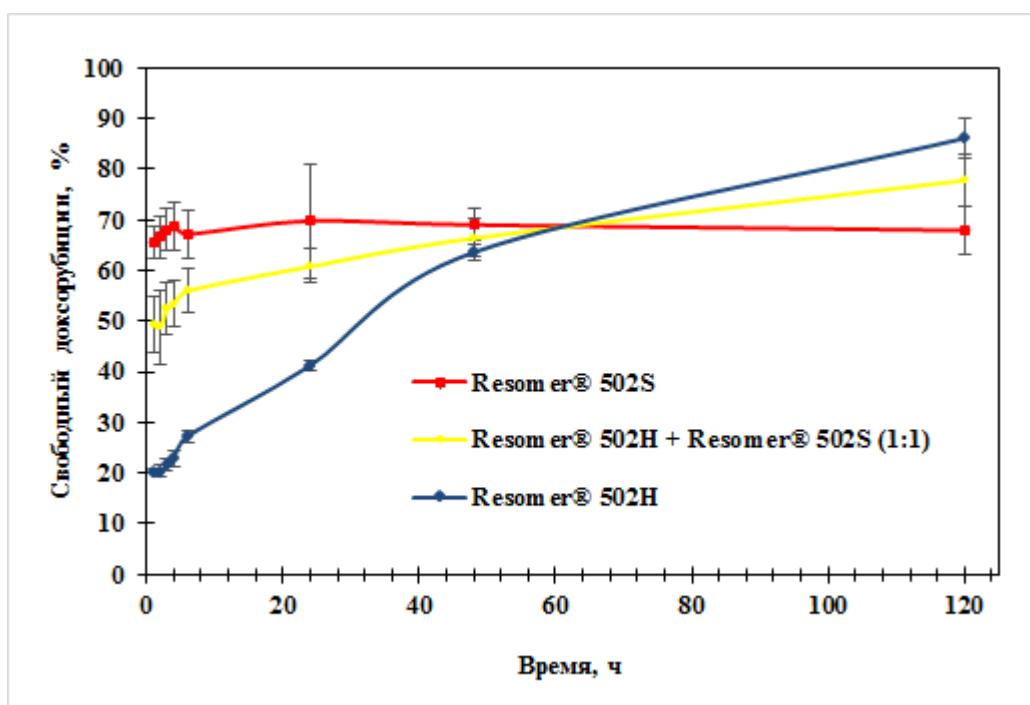


Рисунок 35 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 H, PLGA с концевыми сложноэфирными группами Resomer® 502 S, а также их смеси 1:1; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С);  $n=3$

Профиль высвобождения доксорубина при этом также несколько изменяется – если в первые 6 часов кинетически кривые для НЧ на основе смеси резомеров и на основе Resomer® 502H идут практически параллельно, то затем разница становится ощутимой. Вероятно, это обусловлено разницей в градиентах концентраций между матрицей наночастиц и приемной средой. Через сутки в НЧ, состоящих из смеси полилактидов, остается чуть более 40% от исходной нагрузки доксорубина и около 60% его находится в приемной среде. В то время как в НЧ, полностью состоящих из Resomer® 502H, соотношение концентраций в наночастицах и приемной среде существенно иное: в НЧ осталось еще около 75% от исходного количества доксорубина и только 25% высвободилось в приемную среду.

Полученные данные согласуются с результатами Luan X. и соавт., которые отмечали возрастание начального «burst-эффекта» при уменьшении доли полимера с концевыми кислотными группами в композиции при исследовании кинетики высвобождения лейпрорелина из полилактидных микросфер. В то же время, как видно из рисунка 35, в нашем случае было отмечено противоположное влияние наличия концевых карбоксильных групп на дальнейшую скорость высвобождения доксорубина. Если Luan X. и соавт. наблюдали понижение скорости высвобождения лейпрорелина при увеличении доли PLGA с концевыми кислотными группами

(авторы объясняли это сильным электростатическим связыванием ЛВ с матрицей полимера, замедляющим скорость его высвобождения из микросфер), то в нашем случае, вероятно, превалирующую роль сыграла большая гидрофильность матрицы из полилактида с концевыми карбоксильными группами по сравнению с полилактидом с концевыми эфирными группами и, как следствие, более высокая скорость захвата воды, набухания и, менее вероятно, первых этапов гидролиза матрицы [275]. В нашем случае (рисунок 35) – чем выше содержание в матрице наночастиц полилактида с концевыми карбоксильными группами, тем выше скорость высвобождения из них доксорубицина. Аналогичное явление было отмечено в работе [276].

Таким образом, изменяя в полимерной матрице НЧ количество (относительную долю) полилактида с концевыми карбоксильными группами, можно регулировать степень включения в НЧ положительно заряженного ЛВ (например, доксорубицина) и величину «burst-эффекта».

#### 3.4.4. PLGA-Dox НЧ с медленным высвобождением доксорубицина

Использование PLGA с вязкостью 0,66 дл/г (Lactel® B6013-2P) вызывало значительное снижение степени включения доксорубицина в НЧ (40%), путем отделения фракции несвязанного доксорубицина путем центрифугирования ( $48254 \times g$ ,  $+18\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 мин) удалось получить НЧ со степенью включения доксорубицина 74,4%, однако нагрузка (%) была крайне низка и составила всего 2,8 % (данные не приведены).

Для повышения степени включения доксорубицина за счет увеличения количества свободных концевых карбоксильных групп, в составе полимерной композиции 20 % высокомолекулярного полимера заменили на низкомолекулярный олигомер. Так, при введении низкомолекулярного олигомера PLGA ( $MW \approx 700-800$  Да) с последующим удалением несвязанной с НЧ фракции доксорубицина степень включения выросла до  $\approx 84\%$ , однако скорость высвобождения доксорубицина в модельную среду осталась высокой ( $\approx 42\%$  в течение 24 часов). Данный подход, таким образом, не позволил получить PLGA-Dox НЧ с существенно замедленным высвобождением.

Одним из способов повысить степень включения ЛВ в гидрофобную матрицу носителя является добавление органических противоионов для образования ионной пары с заряженными молекулами ЛВ [277; 278]. В работе [279] была продемонстрирована возможность образования гидрофобного комплекса доксорубицина с анионным поверхностно-активным веществом – диоктилсульфосукцинатом натрия (АОТ), в эквимолярном соотношении (1:1): электростатическое взаимодействие между АОТ и доксорубицином приводило к образованию гидрофобной ионной пары, что позволило получить блок-сополимерные мицеллы с включенным комплексом. Использование данного подхода к повышению гидрофобности ЛВ

описано для многих ЛВ, в том числе доксорубицина [118], гентамицина [280], иринотекана [281], ванкомицина [282].

В нашем исследовании, НЧ, полученные на основе Resomer® 502Н методом «двойных эмульсий» с АОТ в качестве противоиона, отличались высокой степенью включения ( $\approx 87\%$ ) и очень низкой скоростью высвобождения доксорубицина *in vitro* ( $\approx 25\%$  в течение 24 часов). На рисунке 36 приведены кинетические кривые высвобождения доксорубицина для данных типов НЧ.

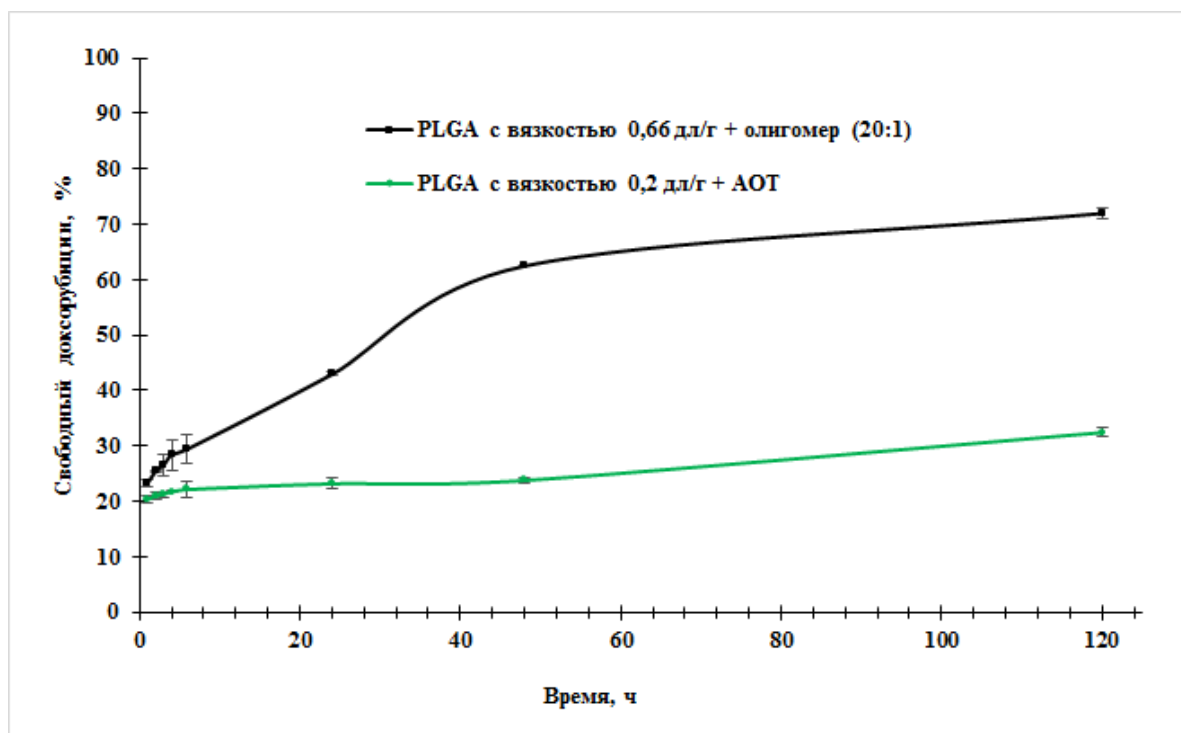


Рисунок 36 – Профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA с высокой вязкостью (0,66 дЛ/г) с добавлением низкомолекулярного олигомера ( $\approx 700$ -800 Да), и НЧ на основе Resomer® 502 Н, содержащих комплекс доксорубицин-АОТ; разведение 1:25, температура инкубации  $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ ,  $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$ );  $n=3$

Кроме того, профиль высвобождения доксорубицина из НЧ с включенным гидрофобным комплексом доксорубицин-АОТ было изучено в кислой среде (0,1 М натрий-ацетатный буфер,  $\text{pH}=4,5$ ), как описано ранее. Как и предполагалось, кислая среда вызывала большее высвобождение доксорубицина в приемную среду, по сравнению с высвобождением в 1 % растворе полоксамера 188: в течение 24 ч в приемную среду высвободилось 47,5 % и 23,2 % доксорубицина, соответственно (рисунок 37). Однако, можно предположить, что в данном случае количества ЛВ, высвобождаемого в единицу времени в клетках опухоли, будет

недостаточно для ингибирования ее роста, что может приводить к недостаточной эффективности терапии. Роль скорости высвобождения ЛВ на противоопухолевую активность систем доставки противоопухолевых агентов была отмечена другими авторами [283].

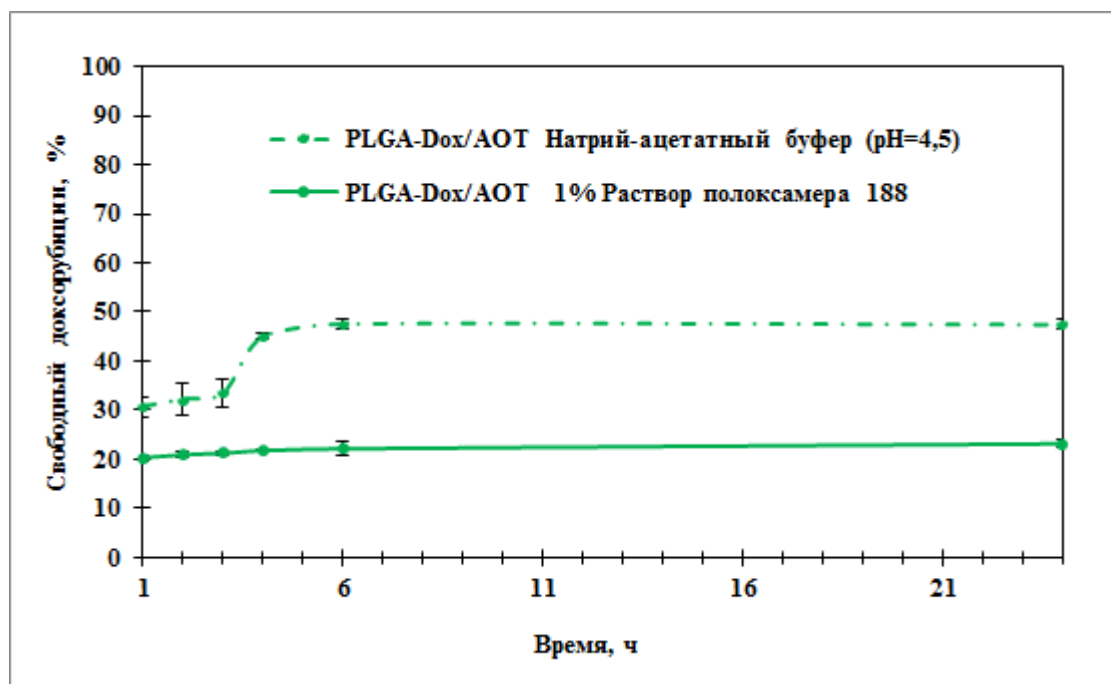


Рисунок 37 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе Resomer® 502 Н, содержащих комплекс доксорубин-АОТ (PLGA-Dox/AOT), в натрий-ацетатном буфере (0,1 М, pH=4,5) и 1 % растворе полоксамера 188; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С); n=3

Таким образом, было проведено комплексное исследование, которое позволило выявить факторы, обеспечивающие возможность получать полилактидные наночастицы с заранее заданным профилем высвобождения из них доксорубина. Изменение pH внешней водной фазы при получении НЧ методом «двойных эмульсий» является простым технологическим приемом, который позволяет получать PLGA-Dox НЧ с различной степенью включения и нагрузкой доксорубина, а также профилем высвобождения доксорубина *in vitro*. Поскольку изменение данного параметра не вызывает таких существенных изменений состава НЧ, как изменение молекулярной массы полимера или введение притивоиона (АОТ), дальнейшие исследования влияния профиля высвобождения на фармакокинетику *in vivo*, а также распределение между плазмой и эритроцитами крови, проводили для наночастиц, полученных при pH=7,4 (PLGA-Dox/7,4) и pH=6,4 (PLGA-Dox/6,4).

### 3.5. Изучение сорбции поллоксамера 188 на поверхности PLGA-Dox НЧ

Поллоксамеры (Pluronic®, Kolliphor®) – амфифильные триблок-сополимеры полиэтиленоксида [РОЕ] и полипропиленоксида [РОР], имеющие структуру  $(\text{РОЕ})_a(\text{РОР})_b(\text{РОЕ})_a$  (рисунок 38). Благодаря поверхностно-активным свойствам поллоксамеры широко используются в фармацевтической промышленности в качестве эмульгаторов [284], солюбилизаторов для гидрофобных лекарств [285], стабилизаторов суспензий, а также находят применение в парентеральных формах [286].

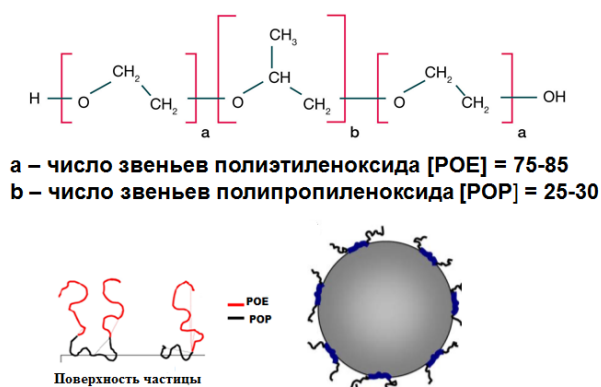


Рисунок 38 – Структура поллоксамера 188

Некоторые поллоксамеры (например, поллоксамер 407) могут применяться для гидрофилизации поверхности полимерных НЧ, в том числе НЧ из полистирола и PLGA, для обеспечения длительной циркуляции в крови («стелс-эффект») [54]. Известно также, что модификация поверхности наночастиц поллоксамером 188 способствует проникновению наночастиц через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Так ранее было показано, что наносомальная форма доксорубицина на основе наночастиц PLGA, модифицированных поллоксамером 188, проявляет высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы 101/8 [5]. В недавнем исследовании I. Khalin и соавт. [287] с помощью двухфотонной микроскопии в эксперименте *in vivo* продемонстрировано, что покрытие поллоксамером (Pluronic® F-68) флуоресцентно-меченных наночастиц PLGA значительно увеличивало время циркуляции наночастиц в крови и облегчало их захват эндотелиальными клетками головного мозга у мышей. При этом авторы однозначно отличили флуоресценцию наночастиц от аутофлуоресценции тканей и продемонстрировали, что они попадают в поздние лизосомы эндотелиальных клеток.

Несмотря на широкий спектр применения поллоксамеров в качестве компонентов ЛФ, в литературе описано ограниченное число аналитических методик для характеристики поллоксамеров, и лишь немногие из них предназначены для количественной оценки содержания

полоксамеров в лекарственных формах с желаемой чувствительностью и точностью. Эти методики основаны в подавляющем большинстве на колориметрическом определении комплексов полоксамера с йодом [176], тиоцианатом кобальта (II) [288] и фосфорномолибденовой кислотой [289]. Кроме того, описана также методика определения полоксамера в ЛФ методом ГПХ [290].

Поскольку перед проведением исследований *in vivo* полученных в настоящем исследовании наноразмерных форм доксорубина на основе PLGA поверхность НЧ модифицировали путем инкубации в растворе 1% полоксамера 188 (Kolliphor® P188, BASF; ККМ 0,32%), необходимо было провести количественный анализ сорбции ПАВ на поверхности НЧ. В данном исследовании использовали репрезентативные серии PLGA-Dox/7,4 НЧ и плацебо-PLGA, также полученных на основе PLGA Resomer® 502Н. Для косвенного подтверждения сорбции полоксамера 188 на поверхности НЧ определяли средний размер и PDI репрезентативных серий наночастиц при ресуспендировании в воде и 1% растворе полоксамера 188 методом DLS (Zetasizer Nano ZS). Средний размер PLGA-Dox/7,4 НЧ составил  $103 \pm 1$  нм (PDI  $0,023 \pm 0,014$ ) в воде и  $115 \pm 1$  нм (PDI  $0,104 \pm 0,022$ ) в 1% растворе полоксамера 188, причем размер НЧ в обоих случаях не изменялся на протяжении 24 инкубации при комнатной температуре. Включение доксорубина в НЧ составило 75,2 %. Размер плацебо-PLGA НЧ составил  $92 \pm 1$  нм (PDI  $0,137 \pm 0,007$ ) в воде и  $96 \pm 1$  нм (PDI  $0,123 \pm 0,010$ ) в 1% растворе полоксамера 188. Таким образом, увеличение гидродинамического диаметра обоих типов НЧ в присутствии полоксамера 188 также косвенно свидетельствовало о сорбции этого ПАВ на их поверхности.

Для количественной оценки сорбции полоксамера 188 на поверхности НЧ PLGA в настоящем исследовании был использован йодометрический метод, основанный на взаимодействии полоксамера 188 с йодом и образовании окрашенного соединения с характерным максимумом поглощения на длине волны 501 нм [176; 291]. Как показали расчетные значения удельной сорбции полоксамера 188 на поверхности НЧ относительно массы полимера (мг/мг) и площади поверхности НЧ ( $\text{мг}/\text{м}^2$ ), нагрузка НЧ доксорубином приводила к существенному повышению сорбции полоксамера 188, при этом для обоих типов наночастиц наблюдался рост сорбции в интервале времени 1-24 ч; приведены в таблице 35. Известно, что адсорбция полоксамера на гидрофобных носителях ЛВ увеличивает диаметр носителя и увеличивает диапазон распределения по размерам (PDI). Согласно данным М. J. Santander-Ortega и соавт. толщина слоя полоксамера 188 (Pluronic® F68, Sigma Aldrich, 850 Да) на поверхности НЧ PLGA 50:50, определенная методом корреляционной спектроскопии (DLS), составила 20 нм, при этом плато адсорбции было достигнуто для количества полоксамера 188 на единицу площади поверхности НЧ  $10 \times 10^{-4}$  г/м<sup>2</sup>. При концентрации, близкой к ККМ (400

мг/л) или превышающей ее, наблюдалось формирование более толстого слоя на поверхности НЧ из-за адсорбции гемимицелл. Изотерма адсорбции полуксамера 188 на НЧ PLGA выходила на плато, когда концентрация была ниже ККМ (100 мг/л) [193]. В нашем исследовании сорбция полуксамера 188 на поверхности была несколько ниже. Для сравнения, при адсорбции полуксамера 188 на поверхности НЧ из полистирола размером 56 нм средний гидродинамический радиус, измеренный тем же методом, увеличился всего на 6 нм; плато изотермы адсорбции было достигнуто на том же уровне,  $9,5 \times 10^{-4}$  г/м<sup>2</sup> [292]. Исследования показывают, что при определенных условиях неионногенные ПАВ могут образовывать поверхностные агрегаты, подобные мицеллам [293; 294], что объясняет ступенчатый вид изотерм адсорбции [295].

Таблица 35 – Значения удельной сорбции полуксамера 188 на поверхности PLGA-Dox/7,4 и плацебо-PLGA НЧ относительно массы полимера (мг/мг) и площади поверхности НЧ (мг/м<sup>2</sup>); средние значения  $\pm$  SD (n=3)

Тип НЧ	Время инкубации, ч	Сорбция полуксамера 188, мкг/мг полимера	Сорбция полуксамера 188 на единицу площади поверхности НЧ, мг/м <sup>2</sup>
PLGA-Dox	0,5	14,65 $\pm$ 3,93	0,30 $\pm$ 0,08
	1	20,95 $\pm$ 2,72	0,48 $\pm$ 0,06
	24	26,13 $\pm$ 5,74	0,50 $\pm$ 0,12
PLGA (плацебо)	1	7,72 $\pm$ 5,45	0,14 $\pm$ 0,09
	4	10,53 $\pm$ 8,01	0,19 $\pm$ 0,19
	24	16,42 $\pm$ 8,31	0,30 $\pm$ 0,11

Таким образом, были изучены количественные параметры сорбции полуксамера на поверхности PLGA НЧ. Выявлено, что нагрузка PLGA НЧ доксорубицином способствует сорбции полуксамера 188, при этом сорбция возрастает в интервале времени 1-24 ч. Показано, что инкубация PLGA НЧ в 1% растворе полуксамера 188 приводит к увеличению гидродинамического диаметра НЧ.

### 3.6. Изучение влияния параметров наносомальной формы доксорубицина на основе PLGA на распределение между плазмой и эритроцитами крови

Результаты данного исследования описаны в статье [296]. Фармакокинетический профиль ЛВ «общая концентрация в плазме – время» дает определенную информацию

касательно времени циркуляции НЧ и ЛВ в системе кровообращения. Однако распределение ЛВ между плазмой и клетками крови, в частности, эритроцитами, поскольку они представляют собой основную фракцию клеток крови как по размеру, так и по количеству, может привести к тому, что значительное количество ЛВ будет связано с клеточной фракцией крови, что приведет к снижению фракции, доступной для нацеливания лекарственного средства.

Известно, что некоторые полимерные НЧ размером 100-200 нм способны нековалентно адсорбироваться на поверхности эритроцитов и оставаться связанными с ней продолжительное время, при этом решающую роль в процессе такого взаимодействия играют заряд и функциональные группы на поверхности НЧ. Так, в эксперименте [297] сорбция гидрофильных отрицательно заряженных НЧ на поверхности эритроцитов не наблюдалась. Таким образом, можно было ожидать, что и связывание PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови также будет незначительным, а общая концентрация доксорубицина в плазме при инкубации данных наносомальных форм в крови будет существенно выше, чем при инкубации субстанции доксорубицина.

Доксорубин, согласно литературным данным, обладает высоким связыванием с эритроцитами ( $K_{RBC/Plasma} > 2$ ), при этом степень связывания отличается в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и зависит от дозы. Так, например, равновесное значение  $K_{Blood/Plasma}$  для доксорубицина *in vivo* у морских свинок составило  $2,4 \pm 0,09$  [298]. При внутривенном введении доксорубицина крысам в дозе 10 мг/кг с эритроцитами связывается 50% введенного препарата [299]. Кроме того, ранее было описано быстрое связывание свободного доксорубицина с эритроцитами человека [300]. Для таких ЛВ рекомендовано определение ФК параметров в цельной крови, однако при условии постоянства константы распределения на всем ожидаемом диапазоне концентраций исследование может быть проведено и в плазме. Поскольку взаимодействие с эритроцитами было ранее показано ранее как для доксорубицина, так и для наночастиц PLGA [301], было исследовано распределение наносомальных форм доксорубицина между плазмой и эритроцитами чтобы обеспечить более надежное предсказание фармакокинетического поведения и биораспределения данных форм.

Как правило, для определения концентрации ЛВ в плазме и эритроцитах препарат инкубируют в крови, а затем разделяют плазму и эритроциты с последующим определением ЛВ в обеих фракциях, при этом требуется проводить гемолиз цельной крови и эритроцитов и определять ЛВ в разных матрицах [298; 299; 302]. Для оценки параметров распределения в настоящем исследовании использовали ранее описанный метод [178], который позволяет получать значения коэффициентов связывания ЛВ с эритроцитами, близкие к значениям, определенным традиционным методом. При этом предполагали, что свободный доксорубин, который изначально присутствует в суспензии НЧ и дополнительно высвобождается при

введении в кровь, распределяется между кровью и эритроцитами в соотношении, рассчитанном для контроля (Dox). Поэтому в случае наносомальных форм в плазме определяли именно суммарную концентрацию доксорубина (свободного и связанного с НЧ), чтобы можно было косвенно оценить сколько доксорубина, связанного с НЧ, отделяется с эритроцитами при разделении крови. Однако, в этом случае необходимо ограничивать время инкубации интервалом, в котором стабильность ЛВ в контрольной плазме и цельной крови одинакова в условиях эксперимента, а также не происходит гемолиза эритроцитов; в связи с этим время инкубации препарата было сокращено до 30 минут из-за ограниченной стабильности доксорубина в крови человека [261]. Иллюстрация процесса инкубации представлена на рисунке 39.

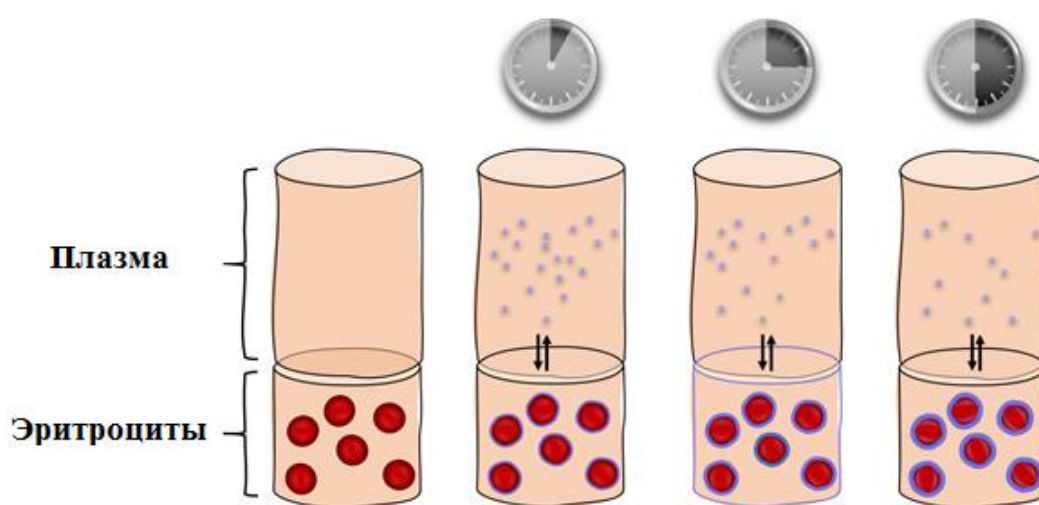


Рисунок 39 – Схематическое изображение анализа распределения общего доксорубина между плазмой и эритроцитами крови

Ранее было показано, что нагруженные доксорубином PLGA НЧ (исследование проводили для формы PLGA-Dox/7,4) в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкг/мл не вызывают существенного гемолиза эритроцитов крови человека в течение по крайней мере 3 ч инкубации с цельной кровью человека при +37 °С [303]. В настоящем эксперименте PLGA-Dox/7,4 НЧ также не вызывали существенного гемолиза эритроцитов при инкубации в течение 2 ч при +37 °С в диапазоне концентраций  $\approx 0,2-200$  мкг/мл по доксорубину (рисунок 40); гемолиз эритроцитов составил всего  $1,26 \pm 0,4$  % при максимальной концентрации НЧ в исследуемом диапазоне (200 мкг/мл).

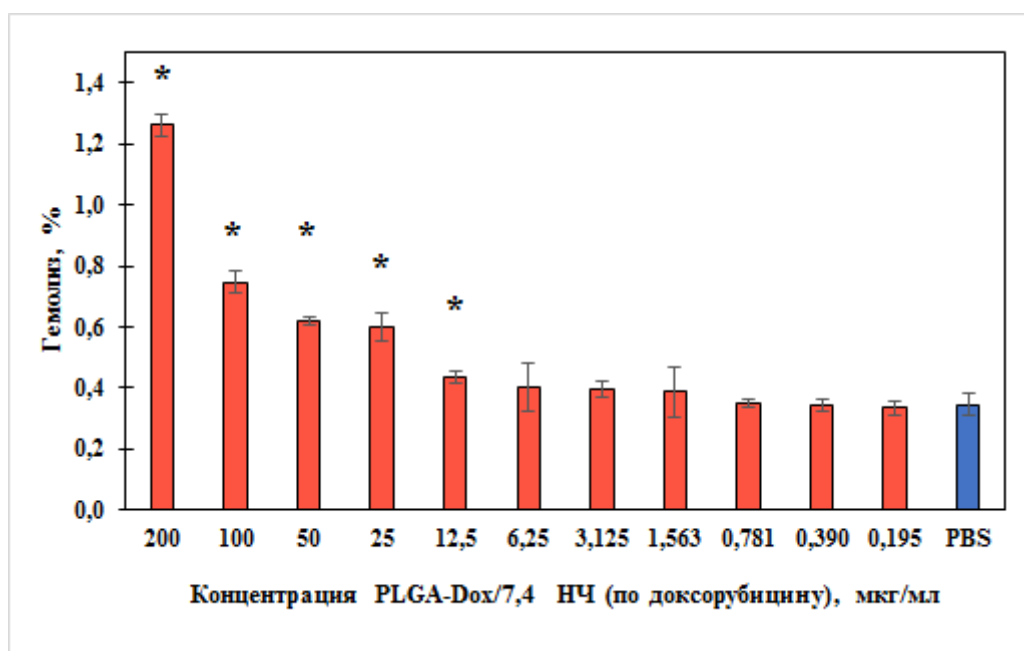


Рисунок 40 – Гемолиз эритроцитов (%) при инкубации с PLGA-Dox/7,4 НЧ в диапазоне концентраций  $\approx 0,2$ -200 мкг/мл по доксорубину по сравнению с (-) контролем (инкубация в фосфатно-солевом буфере) в течение 2 ч, +37 °С; n=5, \* – p < 0,05; гемолиз (%) рассчитывали относительно (+) контроля

Параметры распределения, а именно отношение концентрации доксорубина в крови к его концентрации в плазме ( $K_{\text{Blood/Plasma}}$ ) и отношение концентрации доксорубина в эритроцитах к его концентрации в плазме ( $K_{\text{RBC/Plasma}}$ ), были рассчитаны для общего (свободный + связанный с НЧ) доксорубина в сравнении с доксорубином в свободном виде (субстанция, контроль - Dox) в диапазоне 10-100 мкг/мл по доксорубину через 5, 15 и 30 мин инкубации в цельной крови, полученной от здоровых добровольцев. Данные параметры исследовали для наносомальных форм PLGA-Dox/7,4 и форм PLGA-Dox/6,4, обладающих различной степенью включения доксорубина, а также НЧ, отмытых от свободной фракции доксорубина – PLGA-Dox/7,4(G-25) PLGA-Dox/6,4(G-25), чтобы также продемонстрировать влияние нагрузки доксорубина в НЧ на распределение. Усредненные значения физико-химических параметров данных типов НЧ приведены в разделе 3.1. Результаты приведены в таблице 36 и на рисунке 41.

Таблица 36 – Значение коэффициентов распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами крови в зависимости от общей концентрации доксорубина и времени инкубации в цельной крови человека; средние значения  $\pm$  SD, n=3. Адаптировано из [296]

			Время инкубации					
			5 мин		15 мин		30 мин	
Параметры связывания			K <sub>RBC/Plasma</sub>	K <sub>Blood/Plasma</sub>	K <sub>RBC/Plasma</sub>	K <sub>Blood/Plasma</sub>	K <sub>RBC/Plasma</sub>	K <sub>Blood/Plasma</sub>
Концентрация доксорубина, мкг/мл	10	Dox	0,83 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,03	2,15 $\pm$ 0,02	1,46 $\pm$ 0,02	2,25 $\pm$ 0,03	1,50 $\pm$ 0,03
		PLGA-Dox/6,4	0,84 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,01	1,94 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,04	1,83 $\pm$ 0,05	1,33 $\pm$ 0,05
		PLGA-Dox/7,4	0,72 $\pm$ 0,03	0,89 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,03	1,50 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,02
	50	Dox	0,76 $\pm$ 0,04	0,90 $\pm$ 0,04	2,42 $\pm$ 0,05	1,57 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,02	1,52 $\pm$ 0,02
		PLGA-Dox/6,4	0,75 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	2,10 $\pm$ 0,03	1,44 $\pm$ 0,03	2,00 $\pm$ 0,04	1,4 $\pm$ 0,04
		PLGA-Dox/7,4	0,69 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,03	1,28 $\pm$ 0,04	1,11 $\pm$ 0,04	1,52 $\pm$ 0,01	1,21 $\pm$ 0,01
	100	Dox	0,73 $\pm$ 0,06	0,89 $\pm$ 0,06	2,53 $\pm$ 0,03	1,61 $\pm$ 0,03	2,73 $\pm$ 0,03	1,69 $\pm$ 0,03
		PLGA-Dox/6,4	0,70 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	2,07 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,05	1,98 $\pm$ 0,02	1,39 $\pm$ 0,02
		PLGA-Dox/7,4	0,68 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,03	1,42 $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,03	1,34 $\pm$ 0,06	1,14 $\pm$ 0,06

Как показали результаты данного исследования, включенный в НЧ доксорубин связывается с эритроцитами медленнее и в меньшем количестве, чем свободный, причем во всех случаях равновесие наступает через 15 минут после начала инкубации, а величина констант распределения не зависит от исходной концентрации доксорубина (таблица 35). На основании значений  $K_{\text{Blood/Plasma}}$  было рассчитано, что общее количество связанного с эритроцитами доксорубина через 5 минут инкубации в крови (до наступления равновесия) для всех наносомальных форм не отличалось от контроля (Dox) и составило  $33 \pm 2$  % ( $p > 0,05$ ) во всем диапазоне концентраций. Отмечено, что по равновесным параметрам распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами крови форма PLGA-Dox/6,4 близка к субстанции доксорубина, видимо, вследствие преимущественной сорбции доксорубина на поверхности НЧ в процессе получения и значительной десорбции с поверхности при попадании в кровь. Так связывание с эритроцитами доксорубина через 15 минут инкубации в крови данных форм в концентрации 50 мкг/мл составило  $58 \pm 1$  % и  $62 \pm 1$  %, соответственно. При этом

для формы PLGA-Dox/7,4, отличающейся большей степенью включения доксорубина, в тех же условиях отмечено меньшее связывание с эритроцитами ( $46 \pm 1$  %), при этом в плазме остается больше доксорубина, чем в случае формы PLGA-Dox/6,4 или свободного доксорубина ( $p < 0,05$ ). Отмытые от несвязанного доксорубина НЧ PLGA-Dox/6,4(G-25) обладали самой низкой равновесной степенью связывания с эритроцитами крови (рисунок 41). В этом случае связывание с эритроцитами оставалось таким же, каким было через 5 минут инкубации ( $34 \pm 1$  %). При этом значения параметров распределения для неотмытых PLGA-Dox/7,4 и отмытых PLGA-Dox/7,4(G-25) не отличались.

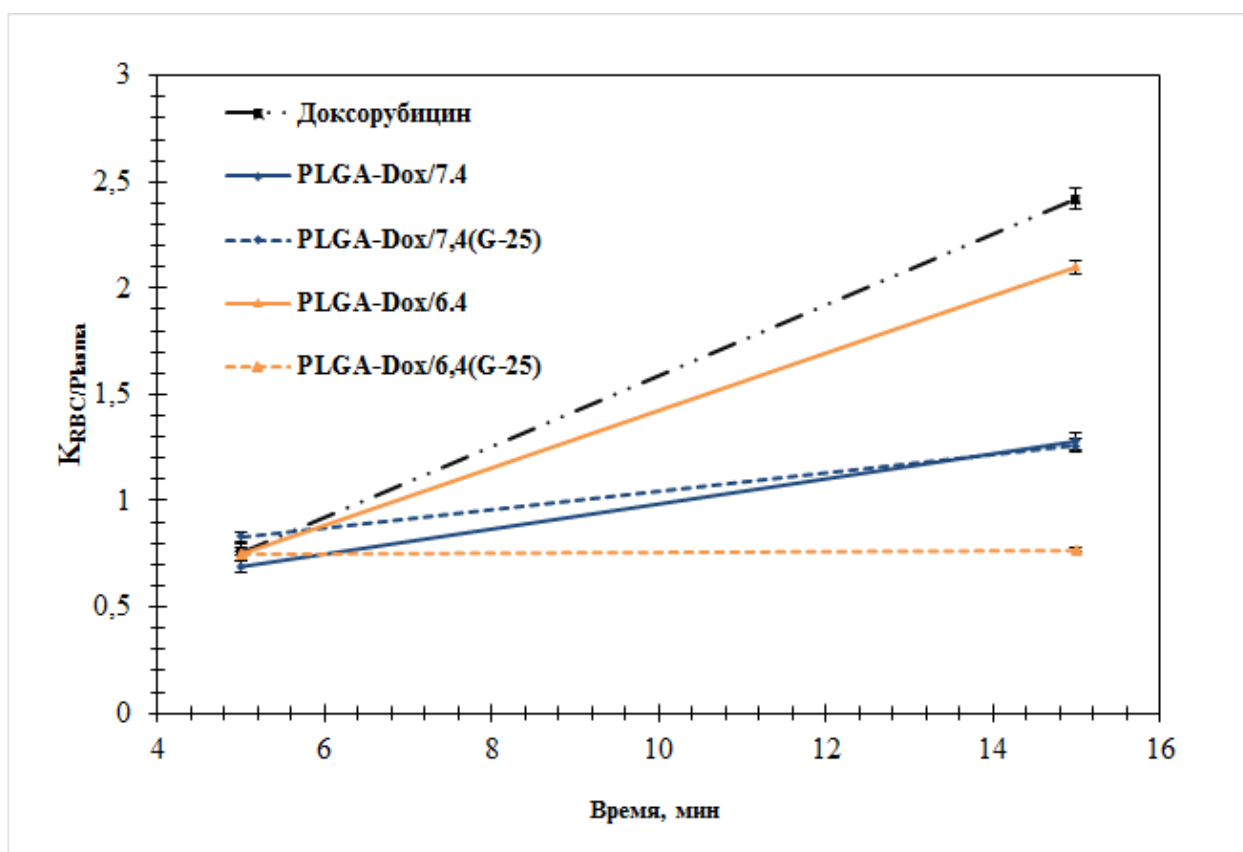


Рисунок 41 – Значения коэффициентов распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами после инкубации доксорубина (контроль) и наносомальных форм доксорубина в концентрации 50 мкг/мл в крови, средние значения  $\pm$  SD,  $n=3$ . Адаптировано из [296]

Таким образом, равновесные коэффициенты распределения доксорубина между плазмой и форменными элементами крови зависели от степени включения и нагрузки доксорубина в PLGA-Dox НЧ. Как правило, наночастицы могут взаимодействовать с эритроцитами путем адсорбции на мембране или интернализации [301]. Для отмытых PLGA-Dox/6,4(G-25) было отмечено самое низкое связывание с эритроцитами, при этом равновесие

достигалось уже через 5 минут после начала инкубации; данная форма предположительно содержала наименьшее количество доксорубина, адсорбированного на поверхности или приповерхностном слое полимерной матрицы НЧ. Подобный эффект не наблюдался для PLGA-Dox/7,4(G-25) и неотмытых PLGA-Dox/6,4. Данное наблюдение позволяет сделать вывод о том, что распределение доксорубина при инкубировании наносомальных форм в цельной крови происходило в большей степени из-за связывания с эритроцитами высвобожденной из НЧ фракции ЛВ или в результате перераспределения адсорбированного на поверхности НЧ ЛВ в ответ на взаимодействие с мембраной эритроцита, чем за счет адсорбции НЧ на поверхности эритроцитов.

Таким образом, включение доксорубина в НЧ позволяет повысить общую концентрацию доксорубина в плазме после введения в кровь относительно субстанции при введении в одинаковой дозе по доксорубину; причем чем выше степень включения и нагрузка доксорубина в НЧ, тем меньше значение коэффициентов распределения доксорубина между эритроцитами и плазмой крови ( $K_{\text{Blood/Plasma}}$  и  $K_{\text{RBC/Plasma}}$ ). Различие в связывании с эритроцитами между свободным и связанным с НЧ доксорубином может оказывать таким образом влияние на ФК параметры при внутривенном введении. На основании этих данных, предполагается более высокая нацеливающая способность PLGA-Dox/7,4 НЧ *in vivo*.

### **3.7. Исследование фармакокинетики наносомальных форм доксорубина с различным профилем высвобождения в плазме крови крыс**

За последние десятилетия был разработан широкий спектр нано-препаратов для доставки ЛВ в центральную нервную систему [7; 141; 148]. После введения носителя в кровотоки в распределении и элиминации ЛВ участвуют несколько процессов, которые происходят параллельно. Во-первых, происходит аккумуляция (накопление) НЧ в различных органах и тканях в соответствии с их природой и физико-химическими свойствами, при этом помимо ожидаемого накопления в целевых тканях (в данном случае – ткани мозга) происходит также накопление в нецелевых органах, и в первую очередь в печени, которая содержит основную популяцию резидентных макрофагов (купферовских клеток), имеющих непосредственный контакт с кровью, а также в селезенке, лимфатических узлах и легких.

Тем не менее, модификация поверхности НЧ молекулами, способствующими проникновению НЧ через ГЭБ, такими как полисорбат 80 и поллоксамер 188, позволяет повысить накопление ЛВ, связанных с НЧ, в тканях мозга, то есть повысить эффективность «нацеливания». Предполагается, что полисорбат 80, сорбированный на поверхности

полимерных НЧ, может оказывать тройное действие: позволяет увеличить время циркуляции НЧ в крови за счет уменьшения захвата клетками РЭС; стимулирует (опосредованно) рецептор-зависимый трансцитоз; оказывает непосредственное влияние на плотные контакты ГЭБ [21; 125]. Что касается полоксамера 188, как было отмечено ранее, В. Petri и соавт. высказано предположение, что доставка ПБЦА наночастиц, нагруженных доксорубицином, в мозг осуществляется путём рецептор-опосредованного эндоцитоза после взаимодействия аполипопротеина ApoA-I, адсорбированного на поверхности НЧ, со скавенджер-рецептором BI (SR-BI), экспрессированным на поверхности эндотелиальных клеток, формирующих ГЭБ, который участвует в переносе липидов от ApoA-I внутрь клетки [132]. Таким образом, после внутривенного введения носитель ЛВ с течением времени тем или иным образом покидает кровоток, а вместе с ним и связанная фракция ЛВ; этот процесс характеризуется таким показателем как «время полувыведения носителя» ( $t_{1/2}$ ).

Во-вторых, при внутривенном введении наносомальной лекарственной формы ЛВ постепенно высвобождается из НЧ, таким образом, фракция ЛВ, доступная для «нацеливания» со временем снижается. Профиль высвобождения ЛВ *in vivo* зависит от физико-химически параметров НЧ и во многом отвечает за величину накопленной фракции ЛВ; данный параметр является ключевой характеристикой, которая вместе с периодом полувыведения носителя отвечает за способность нано-препаратов доставлять ЛВ в целевые ткани. Кроме того, НЧ могут иначе взаимодействовать с белками и форменными элементами крови, чем ЛВ в свободном виде, а также имеют ограниченную проницаемость через эндотелий капилляров сосудистого русла, что обуславливает различие в поведении в организме свободного — выделившегося в процессе циркуляции — ЛВ, и ЛВ, связанного с его носителем.

В соответствии с международными рекомендациями [158; 189; 304], для лекарственных средств, содержащих наноматериалы, при исследовании фармакокинетики необходимо определение не только суммарных (общей) концентраций ЛВ в плазме, но также и отдельно свободного и связанного с носителем ЛВ. В рамках настоящей работы было проведено исследование взаимосвязи между профилем высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox наночастиц *in vitro* и фармакокинетическими параметрами для свободного и общего (свободный + связанный с НЧ) доксорубицина в плазме крови крыс при однократном внутривенном введении наносомальных форм в 1 % растворе полоксамера 188 по сравнению с субстанцией доксорубицина в воде (контроль) в дозе 5 мг/кг. Результаты исследования описаны в статье [259]. Для углубленного понимания процессов распределения наносомальных форм при внутривенном введении и оценки взаимосвязи между профилем высвобождения доксорубицина из наночастиц в модельные среды и плазму *in vitro* и фармакокинетическими параметрами наносомальной формы *in vivo* была разработана методика разделения и количественного

определения (ВЭЖХ со спектрофлуориметрическим детектированием) свободного и связанного с наночастицами доксорубина в образцах крови и плазмы. Для количественного определения использовали методику, описанную в фармакопее ВР с модификациями; предел количественного определения составил 0,007 мкг/мл доксорубина в плазме. Типовая хроматограмма испытуемого раствора приведена на рисунке 42.

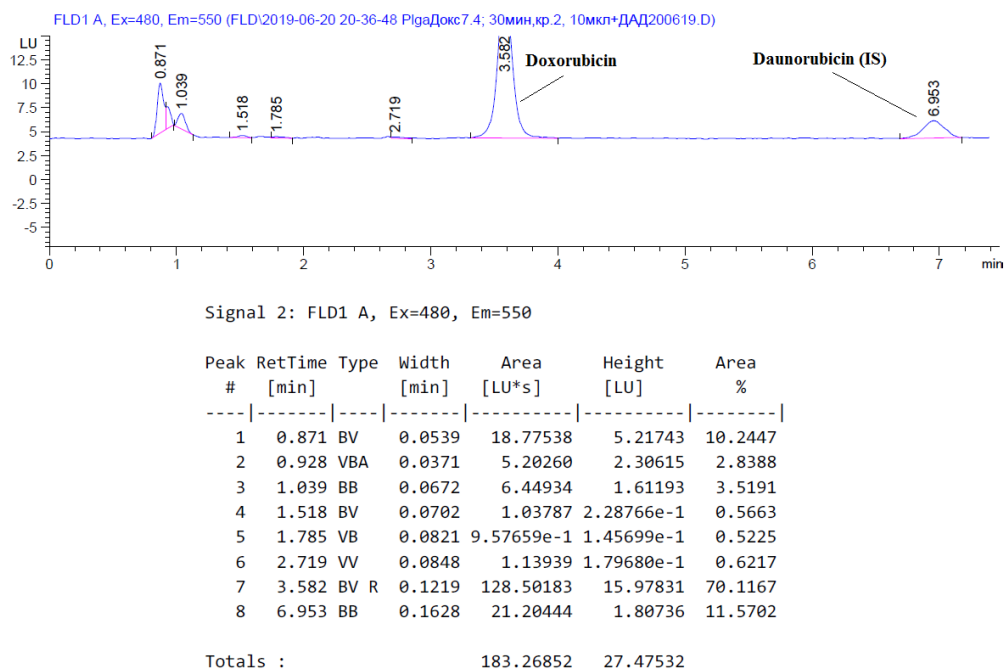


Рисунок 42 – Хроматограмма пробы плазмы крови через 30 мин после введения PLGA-Dox/7,4 НЧ в дозе 5 мг/кг; время удерживания доксорубина – 3,582 мин, время удерживания даунорубина (внутренний стандарт) – 6,953 мин; объем вкола – 10 мкл

Поскольку ранее было показано, что модификация PLGA наночастиц, нагруженных доксорубином, полуксамером 188 способствует проявлению большей эффективности в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс *in vivo* [2], соответственно, в этом исследовании поверхность PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 также модифицировали полуксамером 188 перед введением животным. Значения концентрации общего и свободного (не связанного с НЧ) доксорубина в плазме крови крыс, которым вводили доксорубин в дозе 5 мг/кг в форме суспензий наночастиц PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 в 1 % растворе полуксамера 188, приведены в таблицах 37-40, соответственно. Значения концентрации доксорубина в плазме крови крыс, которым вводили доксорубин в дозе 5 мг/кг в виде раствора субстанции доксорубина гидрохлорида в воде (2 мг/мл), приведены в таблице 41.

Таблица 37 – Концентрации общего доксорубина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/7,4 в 1 % растворе полоксамера 188

№	Время после введения								
	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	24 ч	48 ч	
Концентрация доксорубина в плазме, нг/мл	1	8725,63	1746,40	326,99	56,46	49,00	57,20	16,35	7,22
	2	15434,08	1218,97	404,63	59,29	37,79	39,96	18,72	5,52
	3	11405,60	1900,08	378,00	48,41	26,55	37,47	21,91	8,43
	4	11658,24	1033,40	239,50	65,59	35,36	32,62	19,04	8,29
	5	19358,42	1646,08	195,86	52,63	45,71	38,21	14,90	6,19
	6	8063,92	1035,50	421,42	41,43	55,58	30,69	20,01	6,89
Среднее (арифметическое)	<b>12440,98</b>	<b>1430,07</b>	<b>327,73</b>	<b>53,97</b>	<b>41,66</b>	<b>39,36</b>	<b>18,49</b>	<b>7,09</b>	
SD	4276,84	380,85	92,08	8,48	10,46	9,43	2,52	1,14	
RSD, %	34,38	26,63	28,10	15,71	25,11	23,95	13,65	16,14	
Среднее (геометрическое)	11868,81	1387,17	315,63	53,40	40,50	38,54	18,34	7,01	
Медиана	11531,92	1432,53	352,50	54,55	41,75	37,84	18,88	7,05	

Таблица 38 – Концентрации свободного доксорубина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/7,4 в 1 % растворе полоксамера 188

№	Время после введения								
	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	24 ч	48 ч	
Концентрация доксорубина в плазме, нг/мл	1	2722,23	521,28	287,17	47,71	35,13	48,14	15,25	10,50
	2	2961,29	572,96	240,14	57,35	50,85	32,32	17,20	9,80
	3	4872,94	704,99	259,19	43,45	40,21	36,30	20,60	12,01
	4	3821,70	370,55	196,22	63,37	36,32	34,16	23,12	10,06
	5	4381,02	610,78	154,16	51,90	58,64	37,16	13,72	8,23
	6	2589,97	270,39	248,84	48,55	48,68	31,03	17,46	11,56
Среднее (арифметическое)	<b>3558,19</b>	<b>508,49</b>	<b>230,95</b>	<b>52,05</b>	<b>44,97</b>	<b>36,52</b>	<b>17,89</b>	<b>10,36</b>	
SD	945,26	160,69	47,89	7,23	9,27	6,15	3,46	1,35	
RSD, %	26,57	31,60	20,73	13,89	20,61	16,83	19,32	13,03	
Среднее (геометрическое)	3455,84	484,19	226,37	51,65	44,19	36,13	17,62	10,28	
Медиана	3391,50	547,12	244,49	50,22	44,44	35,23	17,33	10,28	

Таблица 39 – Концентрации общего доксорубина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/6,4 в 1 % растворе полоксамера 188

№		Время после введения							
		5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Концентрация доксорубина в плазме, нг/мл	1	12682,67	1300,94	81,57	61,03	54,59	75,92	22,07	15,94
	2	12511,15	844,21	189,88	65,49	60,56	49,75	28,28	15,73
	3	6948,62	1459,27	96,12	89,97	56,83	50,37	14,25	18,94
	4	12477,95	840,03	140,09	64,52	51,52	69,94	17,35	8,95
	5	10410,57	932,14	131,99	66,81	51,06	65,48	28,35	12,97
	6	7169,70	1322,31	117,86	59,76	56,19	63,19	17,13	9,62
Среднее (арифметическое)		<b>10366,78</b>	<b>1116,48</b>	<b>126,25</b>	<b>67,93</b>	<b>55,12</b>	<b>62,44</b>	<b>21,24</b>	<b>13,69</b>
SD		2695,40	275,11	38,07	11,13	3,56	10,53	6,03	3,91
RSD, %		26,00	24,64	30,16	16,38	6,46	16,87	28,39	28,53
Среднее (геометрическое)		10044,33	1088,08	121,67	67,27	55,03	61,68	20,53	13,21
Медиана		11444,26	1116,54	124,92	65,01	55,39	64,34	19,71	14,35

Таблица 40 – Концентрации свободного доксорубина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/6,4 в 1 % растворе полоксамера 188

№		Время после введения							
		5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	24 ч	48 ч
Концентрация доксорубина в плазме, нг/мл	1	7092,88	724,96	71,82	84,72	62,05	69,12	26,21	12,05
	2	7908,06	520,63	168,65	68,96	62,53	53,87	19,29	14,04
	3	4216,83	792,68	96,20	98,15	53,82	54,38	15,37	14,89
	4	5437,92	519,35	119,33	56,33	54,34	59,83	16,49	10,05
	5	4935,93	489,40	126,60	72,08	56,11	65,34	19,26	10,70
	6	4505,22	709,91	103,83	57,19	56,46	53,40	19,74	11,21
Среднее (арифметическое)		<b>5682,81</b>	<b>626,16</b>	<b>114,41</b>	<b>72,90</b>	<b>57,55</b>	<b>59,32</b>	<b>19,40</b>	<b>12,16</b>
SD		1489,54	130,96	32,78	16,22	3,81	6,66	3,78	1,92
RSD, %		26,21	20,91	28,65	22,25	6,62	11,23	19,46	15,80
Среднее (геометрическое)		5530,10	614,77	110,58	71,46	57,45	59,02	19,11	12,03
Медиана		5186,92	615,27	111,58	70,52	56,29	57,10	19,28	11,63

Таблица 41 – Концентрации доксорубина в плазме крови крыс после введения раствора субстанции доксорубина гидрохлорида в воде (2 мг/мл)

№	Время после введения								
	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	24 ч	48 ч	
Концентрация доксорубина в плазме, нг/мл	1	1529,03	137,39	83,49	56,40	36,16	36,39	12,89	7,77
	2	1106,76	120,81	88,59	47,30	47,12	41,70	20,14	7,25
	3	1735,75	137,40	72,48	67,75	41,08	37,94	14,01	7,67
	4	1038,08	139,68	72,30	41,65	38,05	34,44	17,21	9,22
	5	1118,69	118,57	89,43	51,88	44,61	32,58	13,70	9,02
	6	1063,92	133,45	78,99	61,51	41,35	31,04	11,79	6,44
Среднее (арифметическое)	1265,37	131,22	80,88	54,41	41,40	35,68	14,96	7,90	
SD	293,15	9,18	7,58	9,51	4,05	3,86	3,12	1,06	
RSD, %	23,17	6,99	9,37	17,48	9,78	10,81	20,86	13,45	
Среднее (геометрическое)	1239,66	130,94	80,58	53,71	41,23	35,51	14,71	7,84	
Медиана	1112,72	135,42	81,24	54,14	41,22	35,41	13,85	7,72	

Первоначально ключевые параметры, включая  $C_{max}$ , AUC, CI и V, были рассчитаны внемоделным методом (2.10.5). На следующем этапе для анализа высвобождения доксорубина *in vivo* и нацеливающей способности наночастиц, нагруженных доксорубином была использована физиологически обоснованная биофармацевтическая модель (PBNB), разработанная и адаптированная для данного исследования группой проф. Маттиаса Г. Вакера (Национальный университет Сингапура).

### 3.7.1. Анализ фармакокинетических данных внемоделным методом

Результат анализа фармакокинетических данных внемоделным методом представлен в таблице 42. Как и ожидалось, включение доксорубина в состав НЧ приводило к существенному увеличению концентрации общего доксорубина в плазме крови в течение первых 30 минут после введения по сравнению с субстанцией доксорубина; разница наиболее существенна в первые минуты после введения, причем  $C_{max}(PLGA-Dox/7,4_{Total}) > C_{max}(PLGA-Dox/6,4_{Total}) > C_{max}(Доксорубин)$ . Концентрации свободного (несвязанного с НЧ) также выше после введения наносомальных форм по сравнению с субстанцией, однако  $C_{max}(PLGA-Dox/6,4_{Free}) > C_{max}(PLGA-Dox/7,4_{Free})$ , что можно объяснить большей скоростью высвобождения доксорубина в случае PLGA-Dox/6,4. Различия между содержанием общего и свободного доксорубина в плазме для двух типов НЧ и субстанции статистически значимы

только в течение 1 ч после введения. По сравнению с субстанцией НЧ отличались более высокими значениями AUC и, особенно,  $AUC_{0 \rightarrow 1h}$ , низким значением клиренса (Cl) и низким объемом распределения (V), что свидетельствует о влиянии лекарственной формы на биораспределение доксорубина. Фармакокинетические параметры, полученные для контрольной группы, свидетельствуют о быстром выведении доксорубина из кровообращения, что коррелирует с данными других авторов [305]. Основными движущими силами этого процесса являются распределение в липофильных тканях, а также метаболизм и выведение доксорубина из организма.

Таблица 42 – Фармакокинетические параметры общего и свободного доксорубина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм в дозе 5 мг/кг в сравнении с субстанцией доксорубина, рассчитанные внемодельным методом (n=6). Адаптировано из [259]

Лекарственная форма	Параметр	Среднее значение	Мин.	Макс.	SD	RSD, %
Доксорубин	AUC (нг×ч/мл)	1300,9	1101,8	1459,9	135,8	10,4
	$AUC_{0 \rightarrow 1h}$ (нг×ч/мл)	395,3	314,3	546,8	94,2	23,8
	$C_{max}$ (нг/мл)	1265,4	1038,1	1735,8	293,2	23,2
	Cl (мл/ч)	662,7	600,4	790,1	68,2	10,3
	V (мл)	13498,2	10483,7	16525,7	2374,4	17,6
PLGA-Dox/7,4 <sub>Total</sub>	AUC (нг×ч/мл)	4603,8	3294,2	6532,7	1247,1	27,1
	$AUC_{0 \rightarrow 1h}$ (нг×ч/мл)	3589,5	2329,7	5615,4	1298,5	36,2
	$C_{max}$ (нг/мл)	12441,0	8063,9	19358,4	4276,8	34,4
	Cl (мл/ч)	219,5	149,6	286,1	52,5	23,9
	V (мл)	1576,8	547,9	2603,2	789,0	50,0
PLGA-Dox/7,4 <sub>Free</sub>	AUC (нг×ч/мл)	2064,8	1781,1	2476,3	273,9	13,3
	$AUC_{0 \rightarrow 1h}$ (нг×ч/мл)	1051,6	819,5	1397,9	244,8	23,3
	$C_{max}$ (нг/мл)	3558,2	2590,0	4872,9	945,3	26,6
	Cl (мл/ч)	414,4	338,4	455,9	45,6	11,0
	V (мл)	8396,6	5111,2	12427,9	2520,0	30,0
PLGA-Dox/6,4 <sub>Total</sub>	AUC (нг×ч/мл)	4434,1	3087,8	5316,0	1017,8	23,0
	$AUC_{0 \rightarrow 1h}$ (нг×ч/мл)	2999,1	1862,9	3834,2	905,3	30,2
	$C_{max}$ (нг/мл)	10366,8	6948,6	12682,7	2695,4	26,0
	Cl (мл/ч)	216,2	169,0	289,1	52,4	24,2
	V (мл)	2506,4	1116,4	4762,4	1242,1	49,6
PLGA-Dox/6,4 <sub>Free</sub>	AUC (нг×ч/мл)	2995,3	2402,9	3775,3	574,8	19,2
	$AUC_{0 \rightarrow 1h}$ (нг×ч/мл)	1647,4	1158,1	2461,6	500,2	30,4
	$C_{max}$ (нг/мл)	5682,8	4216,8	7908,1	1489,5	26,2
	Cl (мл/ч)	309,3	239,3	359,7	51,2	16,6
	V (мл)	4224,4	2979,2	6089,0	1262,6	29,9

Как отмечалось выше, полксамер 188 был использован в нашем эксперименте для

повышения доставки PLGA-Dox НЧ через ГЭБ в ткани мозга посредством рецептор-опосредованного трансцитоза. Приведенные в литературе данные о влиянии поллоксамера 188 на фармакокинетику НЧ и, в частности, способности обеспечивать «stealth effect», противоречивы. Как уже было отмечено ранее, «stealth»-агенты (ПЭГ, поллоксамеры и поллоксаминны) обеспечивают длительную циркуляцию НЧ в кровотоке за счет гидрофилизации поверхности, которая позволяет снизить адсорбцию белков-опсонинов и, соответственно, накопление НЧ в богатых резидентными макрофагами органах РЭС. Без покрытия носители небольшого размера ( $\approx 100$  нм и меньше) не могут длительное время оставаться в кровотоке; значительная доля таких НЧ остается в кровообращении только в первые моменты времени после внутривенного введения, а в дальнейшем происходит их накопление в органах РЭС; данный феномен характерен и для НЧ на основе PLGA [306]. Как показывают результаты некоторых исследований *in vitro* поллоксамер 188 снижает захват НЧ макрофагами и, соответственно, потенциально может уменьшать распределение наносомальной формы в органы РЭС [307]. Некоторые авторы напротив, продемонстрировали отсутствие у поллоксамера 188 свойств «stealth»-агента: в исследовании Tröster S. D. и соавт. покрытие НЧ из поли(метилметакрилата) не приводило к снижению накопления НЧ в органах РЭС (печени, селезенке, легких) [308]. Такие противоречия возможно объясняются различием в свойствах макрофагов в живом организме и культуре клеток, а также различиями в дизайне экспериментов [309-311]. Тем не менее, как было отмечено выше, результаты недавно опубликованного исследования [287] свидетельствуют о захвате модифицированных поллоксамером 188 PLGA НЧ эндотелиальными клетками ГЭБ мыши в эксперименте *in vivo*.

Клиренс связанной с PLGA НЧ фракции доксорубина в нашем случае был ниже по сравнению со свободным доксорубином (контроль), однако все же наблюдалось быстрое снижение содержания доксорубина в плазме для наносомальных форм (рисунки 43 и 44). Аналогичные результаты были получены и для других нано-препаратов на основе PLGA [181; 312].

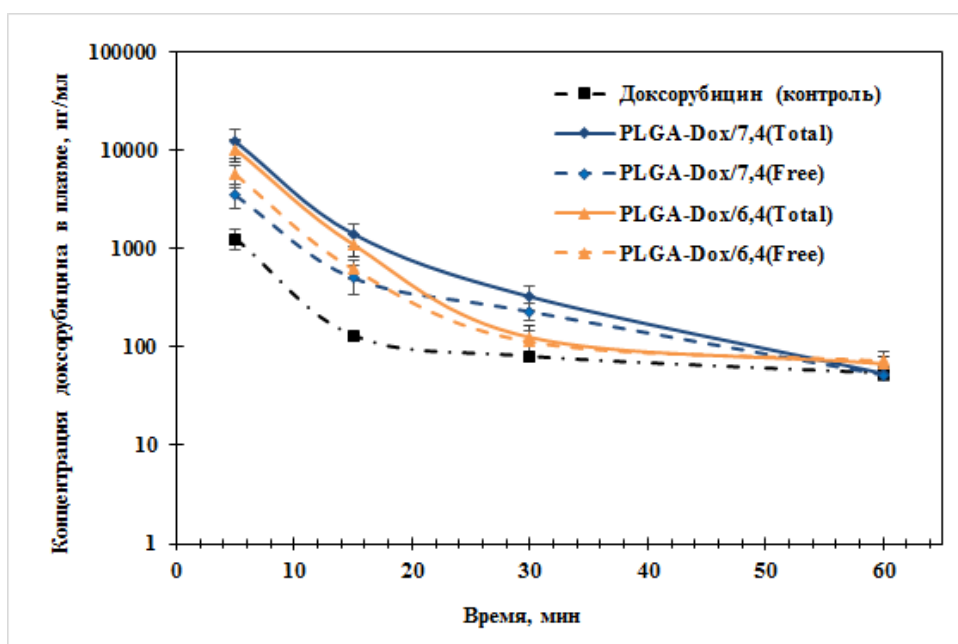


Рисунок 43 – Усредненные фармакокинетические профили (0-1 час) свободного (Free, пунктирная линия) и общего (Total, сплошная линия) доксорубицина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/7,4 (оранжевый) в 1 % растворе полоксамера 188, а также раствора гидрохлорида доксорубицина в воде (контроль) в дозе 5 мг/кг. Адаптировано из [259]

Несмотря на то, что для PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ характерны близкие значения AUC, значительная разница в  $AUC_{0 \rightarrow 1h}$  свидетельствует о различиях в ключевых параметрах данных наносомальных форм. Эти становится более очевидным, если посмотреть на фармакокинетические профили НЧ в течение первого часа после введения. В случае PLGA-Dox/6,4 концентрации общего и свободного доксорубицина в плазме уменьшаются более быстро по сравнению с PLGA-Dox/7,4, что указывает на более быстрое высвобождение ЛВ из системы доставки (рисунок 43). Как было продемонстрировано ранее (3.3), рассматриваемые наносомальные формы проявляли значительный «burst-effect», при этом примерно 50-60% доксорубицина высвобождалось из НЧ в плазме в течение первого часа в условиях эксперимента *in vitro*. Чтобы обеспечить лучшее понимание фармакокинетики рассматриваемых в данном исследовании наносомальных форм доксорубицина, был проведен также количественный анализ свободной (не связанной с НЧ) фракции доксорубицина (рисунки 43 и 44, PLGA-Dox/7,4<sub>FreeDox</sub> и PLGA-Dox/6,4<sub>FreeDox</sub>); при этом параметры фармакокинетики отличались от наблюдаемых после введения доксорубицина в свободной форме (таблица 42).

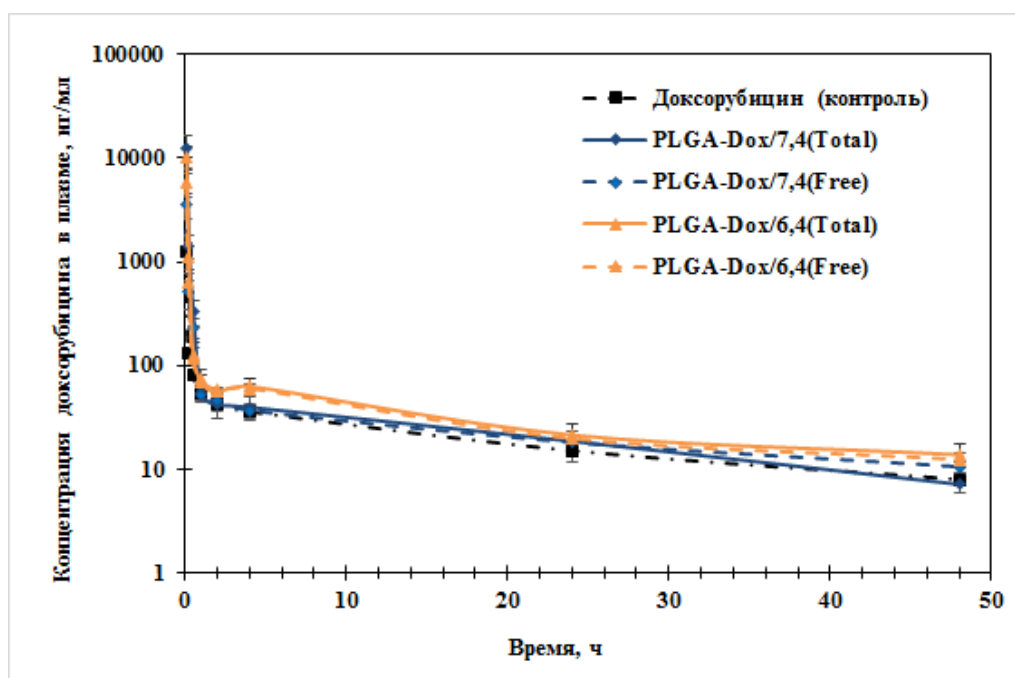


Рисунок 44 – Усредненные фармакокинетические профили (0-48 час) свободного (Free, пунктирная линия) и общего (Total, сплошная линия) доксорубина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/7,4 (оранжевый) в 1 % растворе полоксамера 188, а также раствора гидрохлорида доксорубина в воде (контроль) в дозе 5 мг/кг

Наблюдаемые в течение первого часа различия между значениями параметров для рассматриваемых наносомальных форм, вероятно, можно объяснить различием в высвобождении доксорубина, наблюдаемом в плазме и модельных средах *in vitro*. Следует отметить, что существует определенная вероятность обнаружения ЛВ, связанного с белком или НЧ, в свободной фракции из-за аналитических ограничений метода. В дальнейшем модель PBNB использовалась для более подробного выяснения различий между фармакокинетикой наносомальных форм и для оценки профиля высвобождения доксорубина *in vivo* на основании фармакокинетических данных.

### 3.7.2. Анализ фармакокинетических данных с помощью PBNB модели

Компартментальный анализ профилей «концентрация в плазме - время» был проведен с использованием модели PBNB (рисунок 8) [172]. Модель представляет собой простую, но эффективную альтернативу для анализа фармакокинетики наноразмерных носителей и определяет важные параметры распределения фракции ЛВ, связанной с носителем. В рамках данной модели объем распределения носители ( $V_{DC}$ ), в нашем случае – PLGA-Dox НЧ,

соответствует реальному объему плазмы в организме в условиях эксперимента, в нашем случае, объему плазмы крыс в определенном диапазоне веса [180], поскольку коллоидные носители имеют ограниченную проницаемость через эндотелий капилляров сосудистого русла, то есть ограниченную «подвижность» [172]. По сравнению с более традиционными подходами к моделированию [313], данная модель PBNB использует очень ограниченное количество физиологических параметров, а также объединяет различные органы в камеру «накопления» и периферическую камеру (рисунок 8). Это делает модель более устойчивой к вариативности биораспределения нано-препаратов в организме животных в рамках эксперимента [172].

Распределение и элиминацию свободного (не связанного с НЧ) доксорубина оценивали с использованием фармакокинетических параметров, наблюдаемых для свободного ЛВ, включая  $k_F$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  и  $V_{DF}$ . Модель определила точный объем распределения носителя ( $V_{DC}$ ), параметры высвобождения доксорубина *in vivo* –  $m$ ,  $b$  и  $c$ , а также период полувыведения носителя ( $t^{1/2}$ ) из кривой зависимости общей концентрации в плазме от времени. Расчет параметров высвобождения *in vivo* основан на уравнении 3RPT модели (раздел 2.5.3), которое может применено для оценки профилей высвобождения ЛВ из носителей различной природы [174]. Несмотря на то, что модель основана на законе диффузии Фика [173], благодаря введению переменной, зависящей от времени, она способна моделировать менее предсказуемые события *in vivo*, такие как, например, «burst-effect» или формирование белковой короны.

При сужении диапазона возможных выходных параметров ( $t^{1/2}$ ,  $m$ ,  $b$ ,  $c$ ,  $V_{DC}$ ), заданного для анализа данных, количество комбинаций параметров значительно уменьшается. Согласно предыдущим исследованиям, наночастицы PLGA быстро накапливаются в различных органах [172]. Поэтому предполагалось, что максимальный период полувыведения носителя составляет 0,25-0,75 ч. Все параметры, рассчитанные с помощью модели PBNB, представлены в таблице 43. Кроме того, с помощью PBNB анализа был смоделирован профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vivo* (рисунок 45). Интересно, что для НЧ, полученных при pH 7,4 (PLGA-Dox/7,4) была отмечена более низкая скорость высвобождения доксорубина *in vivo*, что согласуется с гораздо более высокой нацеливающей способностью данной наноразмерной формы – 12,79%, по сравнению с PLGA-Dox/6,4. Объяснением такого поведения *in vivo*, вероятно, является более сильное взаимодействие доксорубина с материалом матрицы наночастиц. Для НЧ, полученных при pH 6,4, была выявлена гораздо более низкая нацеливающая способность – 3,91 %; при этом по результатам математического моделирования примерно 80-90% доксорубина высвобождается в течение нескольких минут *in vivo*. Тем не менее, этот результат не согласуется с полученными аналитическим данным, демонстрирующими гораздо более высокую концентрацию свободного доксорубина в кровотоке, чем если бы доксорубин практически полностью высвобождался из НЧ и

распределялся в периферические ткани.

Таблица 43 – Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубина, рассчитанные с использованием PBNB модели. Адаптировано из [259]

Лекарственная форма	Параметр	Среднее значение	Мин.	Макс.	SD	RSD, %
PLGA-Dox/7,4 <sub>Total</sub>	t <sub>1/2</sub> (ч)	0,263	0,263	0,263	0,000	0,000
	M	0,499	0,499	0,499	0,000	0,000
	B	0,845	0,844	0,845	0,000	0,000
	C	8,023	8,023	8,024	0,000	0,000
	V <sub>DC</sub> (мл)	15,638	15,627	15,645	0,006	0,000
	F <sub>target</sub> (%)	12,790	12,788	12,820	0,012	0,001
PLGA-Dox/6,4 <sub>Total</sub>	t <sub>1/2</sub> (ч)	0,727	0,725	0,730	0,002	0,002
	M	0,382	0,366	0,398	0,012	0,030
	B	0,986	0,986	0,986	0,000	0,000
	C	10,788	10,785	10,791	0,002	0,000
	V <sub>DC</sub> (мл)	13,560	13,555	13,564	0,003	0,000
	F <sub>target</sub> (%)	3,910	3,765	4,052	0,107	0,027

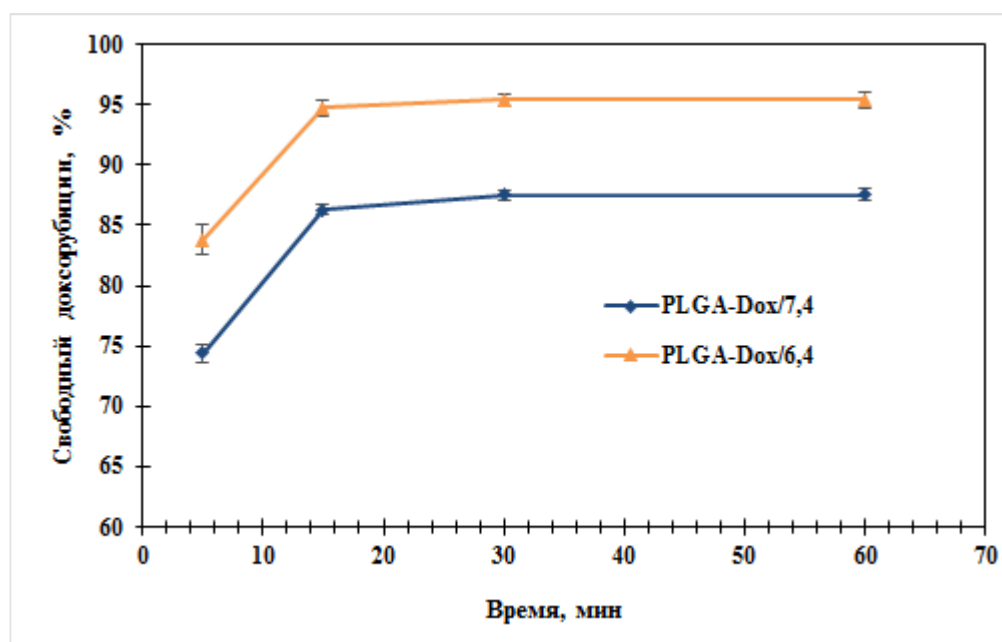


Рисунок 45 – Моделирование высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) *in vivo* с использованием модели PBNB. Адаптировано из [295]

Кроме того, наблюдалась значительная разница в рассчитанных при помощи модели PBNB значений t<sub>1/2</sub> для PLGA-Dox/6,4 (таблица 43, 0,727 ч) и PLGA-Dox/7,4 (таблица 43, 0,263 ч). Принимая во внимание ограниченную информацию о поведении PLGA НЧ *in vivo* и наличии

двух происходящих параллельно относительно быстрых процессов (высвобождение ЛВ и элиминация носителя из кровотока в результате накопления), эта разница может указывать на реальную разницу в скорости элиминации носителя или быть следствием ограниченного набора экспериментальных данных. Поэтому было проведено дополнительное моделирование при сужении интервалов заданных параметров с учетом предполагаемого отсутствия реальной разницы в скорости элиминации наноразмерных форм. Полученное время полувыведения  $0,364 \pm 0,017$  ч ( $\omega$ : 0,5) затем использовали в качестве параметра для определения скорости высвобождения *in vivo* для обоих типов PLGA-Dox НЧ (таблица 44).

Таблица 44 – Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубицина, рассчитанные с использованием PBNB при ограничении диапазона значений времени полувыведения носителя. Адаптировано из [259]

Лекарственная форма	Параметр	Среднее значение	Мин.	Макс.	SD	RSD, %
PLGA-Dox/7,4 <sub>Total</sub>	$t_{1/2}$ (ч)	0,374	0,375	0,372	0,001	0,003
	M	0,468	0,468	0,466	0,000	0,001
	B	0,832	0,840	0,826	0,005	0,006
	C	9,052	9,058	9,046	0,004	0,000
	$V_{DC}$ (мл)	11,935	12,018	11,862	0,050	0,004
	$F_{target}$ (%)	7,415	7,615	7,310	0,110	0,015
PLGA-Dox/6,4 <sub>Total</sub>	$t_{1/2}$ (ч)	0,395	0,401	0,391	0,004	0,009
	M	0,460	0,470	0,449	0,008	0,017
	B	0,880	0,883	0,877	0,002	0,002
	C	11,227	11,256	11,173	0,031	0,003
	$V_{DC}$ (мл)	10,521	10,595	10,433	0,051	0,005
	$F_{target}$ (%)	5,899	6,057	5,740	0,106	0,018

В этих условиях значения объема распределения носителя ( $V_{DC}$ ), периода полураспада ( $t_{1/2}$ ) и нацеливающей способности ( $F_{target}$ ) были гораздо более близкими для PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ. Нацеливающая способность PLGA-Dox/7,4 НЧ снизилась с 12,79 до 7,41 %. Тем не менее, модель подтверждает небольшое различие в нацеливающей способности между типами НЧ, обеспечивая больше доказательств положительного влияния более высокого значения pH на высвобождение доксорубицина *in vivo*. Следовательно, PLGA-Dox/7,4 НЧ имеют более высокий потенциал для успешной доставки доксорубицина в целевые ткани и органы, в нашем случае – тканях мозга после преодоления ГЭБ.

Однако объяснение взаимосвязи между эффективностью nano-препаратов и скоростью высвобождения ЛВ *in vivo* может выходить за рамки влияния последней на фармакокинетику и

нацеливающую способность наночастиц. Прямое сравнение двух стерически стабилизированных липосомальных форм доксорубицина с разной скоростью высвобождения ЛВ позволяет предположить, что меньшее накопление системы доставки в опухоли не обязательно приводит к снижению противоопухолевого эффекта [314]. Действительно, липосомы, которые демонстрировали более высокую скорость высвобождения и более низкую нацеливающую способность, превосходили в отношении ингибирования роста опухоли липосомальную форму, которая доставляла больше доксорубицина в опухоль. Данный эффект, вероятно, объясняется скоростью высвобождения ЛВ в самой ткани опухоли; в случае крайне медленного высвобождения ЛВ в клетках опухоли создаваемой концентрации ЛВ может оказаться недостаточно для ингибирования роста опухоли. Аналогичные результаты были получены и другими авторами, что подтверждает существование баланса между нацеливающей способностью и терапевтической эффективностью наноразмерных форм [283; 315]. Так, описанные ранее нагруженные доксорубицином наночастицы PLGA, покрытые поллоксамером 188, несмотря на более высокую скорость высвобождения ЛВ по сравнению с Doxil® [181], проявляли высокий противоопухолевый эффект в отношении интракраниальной глиобластомы 101/8 [2]. Из-за быстрого роста этой опухоли (со средним временем выживания контроля без лечения приблизительно 16 дней) быстрое высвобождение ЛВ в опухоли может быть особенно полезным. Наряду с благоприятным токсикологическим профилем [5] вышеупомянутый результат указывает на то, что данная система доставки успешно доставляет доксорубицин в мозг и может быть использована для химиотерапии мультиформной глиобластомы. Тем не менее, для выяснения роли высвобождения ЛВ из НЧ *in vivo* и накопления НЧ в процессе доставки требуются дальнейшие исследования. Кроме того, различная скорость высвобождения доксорубицина из PLGA НЧ может по-разному стимулировать специфичный для опухолевых клеток иммунный ответ, что объясняет необходимость углубленного изучения факторов, способных оказывать влияние на эффективность химиотерапии [316].

В настоящее время системы доставки на основе PLGA наночастиц активно исследуются ввиду биосовместимости, способности к биодegradации и возможности контроля профиля высвобождения ЛВ из матрицы НЧ [317]. В частности, исследуются различные стратегии увеличения эффективности накопления нагруженных доксорубицином PLGA НЧ в клетках опухоли мозга. Так, авторы недавно опубликованного исследования [318] продемонстрировали эффективность магнитного нацеливания для увеличения специфического накопления нагруженных доксорубицином PLGA наночастиц, содержащих SPION (суперпарамагнитные наночастицы оксида железа), модифицированных полисорбатом 80, в клетках опухоли в эксперименте *in vivo* модели ортотопической глиомы U87 у мышей. Введение SPION в состав наносомальной формы предоставило также возможность

неинвазивной МРТ-визуализации биораспределения наноразмерной формы *in vivo*.

Таким образом, углубленный анализ высвобождения ЛВ *in vitro* и *in vivo* в сочетании с подробным анализом фармакокинетических параметров PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ пролили новый свет на взаимосвязанные процессы, лежащие в основе доставки ЛВ в мозг. Хотя между данными, полученными экспериментальным путем, и результатами моделирования, основанном на анализе профилей «общая концентрация-время», были некоторые различия, обе методологии привели к аналогичным выводам в отношении дизайна состава PLGA-Dox НЧ. Благодаря более сильному взаимодействию доксорубицина с матрицей НЧ наносомальная форма PLGA-Dox/7,4 больше подходит для адресной доставки доксорубицина в мозг. Тем не менее, скорость высвобождения доксорубицина из НЧ и элиминации НЧ из кровотока очень высока и требует более детального анализа вклада высвобождения ЛВ и накопления НЧ в тканях в целевую доставку доксорубицина в мозг.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования были получены наносомальные формы на основе PLGA с различным профилем высвобождения доксорубицина и установлена значимость влияния отдельных параметров наносомальной формы доксорубицина (средний размер, PDI, заряд поверхности, степень включения доксорубицина) на профиль высвобождения доксорубицина *in vitro* в модельные среды и плазму. Установлена зависимость фармакокинетических параметров наносомальных форм доксорубицина *in vivo* от кинетики высвобождения доксорубицина *in vitro* и исследована возможность прогнозирования профиля высвобождения *in vivo* на основании фармакокинетических параметров, рассчитанных с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели (PBNB).

Разработанные в данном исследовании подходы к получению и анализу наноразмерных форм на основе PLGA с заданным профилем высвобождения Dox в дальнейшем могут быть использованы для прогнозирования поведения *in vivo* на основании физико-химических свойств наночастиц и профиля высвобождения *in vitro*, что позволит выявлять перспективные лекарственные формы на ранних стадиях фармацевтической разработки.

## ВЫВОДЫ

1. Получены наносомальные формы доксорубицина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот с различным профилем высвобождения доксорубицина (PLGA-Dox).

2. Выявлены факторы, влияющие на физико-химические параметры наносомальных форм и профиль высвобождения Dox: pH внешней водной фазы эмульсии, молекулярный вес PLGA, наличие и количество концевых карбоксильных групп PLGA, введение противоиона для получения гидрофобного комплекса с доксорубицином. Установлены основные параметры, определяющие качество разработанных форм PLGA-Dox: средний размер, PDI и  $\zeta$ -потенциал поверхности НЧ, содержание Dox и наличие его примесей, содержание PLGA, вспомогательных веществ, остаточная влажность; профиль высвобождения Dox в модельные среды и профиль гидролитической деградации НЧ. Показано, что оптимальным методом отделения НЧ для определения степени включения Dox в PLGA НЧ является центрифугирование при ускорении  $48254 \times g$  и ультрафильтрация при использовании фильтров с размером пор 50 и 100 кДа (NMWL). Оптимальным методом отделения НЧ при исследовании кинетики высвобождения Dox *in vitro* также является центрифугирование, а наиболее подходящей модельной средой – 1% раствор полоксамера 188; разведение суспензии в отношении 1:25 оптимально для оценки влияния степени включения на величину «burst-effect». Величина первоначального высвобождения Dox в плазме выше, чем в модельных средах.

3. Установлено, что наносомальная форма доксорубицина не оказывает гемолитическое действие. Определены параметры распределения Dox в составе наносомальной формы между плазмой и эритроцитами крови в эксперименте *in vitro*. Установлено, что включенный в наночастицы PLGA-Dox доксорубицин в концентрации 10–100 мкг/мл связывается с эритроцитами крови человека в меньшей степени, чем свободный доксорубицин.

4. Для изучения профиля высвобождения Dox из НЧ в плазме крови человека *in vitro* разработана методика количественного определения (ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием) свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) Dox в плазме, основанная на экстракции Dox при разрушении НЧ и осаждении белков плазмы смесью диметилсульфоксида и ацетонитрила (1:1) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Предел количественного определения Dox в плазме составлял 1,95 мкг/мл, диапазон линейности 2-100 мкг/мл, степень экстракции – 96-104%. Для изучения фармакокинетики наносомальных форм Dox разработана и валидирована методика количественного определения (ВЭЖХ со спектрофлуориметрическим детектированием) свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) Dox в образцах крови и плазмы крыс. В плазме предел количественного определения составлял 0,007 мкг/мл; коэффициент вариации (RSD, %) точности был менее

20%, а степень экстракции Dox более 95%.

5. Определены фармакокинетические параметры двух наносомальных форм доксорубицина (PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4) в плазме крыс при однократном внутривенном введении в дозе 5 мг/кг в 1% растворе полоксамера 188. Так, для общего доксорубицина в случае PLGA-Dox/7,4 НЧ AUC составлял  $4603,8 \pm 1247,1$  нг×ч/мл,  $AUC_{0 \rightarrow 1h} = 3589,5 \pm 1298,5$  нг×ч/мл,  $C_{max}$   $12441,0 \pm 4276,8$  нг/мл,  $Cl$   $219,5 \pm 92,5$  мл/ч,  $V$  –  $1576,8 \pm 789,0$  мл; в случае PLGA-Dox/6,4 НЧ AUC составлял  $4434,1 \pm 1017,8$  нг×ч/мл,  $AUC_{0 \rightarrow 1h} = 2999,1 \pm 905,1$  нг×ч/мл,  $C_{max}$   $10366,8 \pm 2695,4$  нг/мл,  $Cl$   $216,2 \pm 2,4$  мл/ч,  $V$  –  $2506,4 \pm 1242,1$  мл. Связывание доксорубицина с НЧ значительно увеличивало его общую концентрацию в плазме в течение первых 30 минут после введения, уменьшало объем распределения и клиренс и, соответственно, приводило к увеличению AUC (особенно  $AUC_{0 \rightarrow 1h}$ ), по сравнению с введением доксорубицина в свободной форме. По сравнению с PLGA-Dox/7,4 форма PLGA-Dox/6,4 отличалась более высоким значением  $C_{max}$ :  $3558,2 \pm 945,3$  и  $5682 \pm 1489$  нг/мл, соответственно.

6. При анализе фармакокинетических данных с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели выявлена большая нацеливающая способность PLGA-Dox/7,4 (12,79%) НЧ по сравнению с PLGA-Dox/6,4 НЧ (3,91%), которая коррелировала с меньшей спрогнозированной скоростью высвобождения *in vivo*.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

DLS	– метод динамического светорассеяния
Dox	– доксорубицин
EPR	– эффект повышенной проницаемости и накопления ( <i>англ.</i> Enhanced permeability and retention effect)
MDR	– Multidrug resistance множественная лекарственная устойчивость
MW	– молекулярный вес полимера
PBNB	– физиологически обоснованная биофармацевтическая модель ( <i>англ.</i> Physiologically-based nanocarrier biopharmaceutics model)
PDI	– индекс полидисперсности
P-gp	– Р-гликопротеин
PLGA	– сополимер молочной и гликолевой кислот
SD	– стандартное отклонение (standard deviation)
Zaved	– средний размер частиц
ζ-потенциал	– поверхностный потенциал наночастиц
АЦН	– ацетонитрил
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГПХ	– гель-проникающая хроматография
ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДХМ	– дихлорметан
КЭФ	– капиллярный электрофорез
ЛВ	– лекарственное вещество
ЛФ	– лекарственная форма
МК	– муравьиная кислота
НЧ	– наночастицы
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
ПВС	– поливиниловый спирт
ПФ	– подвижная фаза
ПЭМ	– просвечивающая электронная микроскопия
ЦНС	– центральная нервная система

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Rezvantlab S. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment / S. Rezvantlab, N. I. Drude, M. K. Moraveji<sup>1</sup>, N. Güvener, E. K. Koons, Y. Shi, T. Lammers, F. Kiessling // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1260.
2. Gelperina S. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters / S. Gelperina, O. Maksimenko, A. Khalansky, L. Vanchugova, E. Shipulo, K. Abbasova, R. Berdiev, S. Wohlfart, N. Chepurnova, J. Kreuter // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2010. – Vol. 74. – №. 2. – P. 157-163.
3. Wohlfart S. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers / S. Wohlfart, A.S. Khalansky, S. Gelperina, O. Maksimenko, C. Bernreuther, M. Glatzel, J. Kreuter // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6. – №. 5. – P. e19121.
4. Filon O. A phase I study of safety and pharmacokinetics of NanoBB-1-Dox in patients with advanced solid tumors / O. Filon, P. Krivorotko, G. Kobayakov, V. Razjivina, O. Maximenko, S. Gelperina, J. Kreuter // *Journal of Clinical Oncology*, 35 – 2017 – Vol. 35.
5. Pereverzeva E. Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma / E. Pereverzeva, I. Treschalin, M. Treschalin, D. Arantseva, Y. Ermolenko, N. Kumskova, O. Maksimenko, V. Balabanyan, J. Kreuter, S. Gelperina // *International journal of pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 554. – P. 161-178.
6. Malinovskaya Y. Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells / Y. Malinovskaya, P. Melnikov, V. Baklaushev, A. Gabashvili, N. Osipova, S. Mantrov, Y. Ermolenko, O. Maksimenko, M. Gorshkova, V. Balabanyan, J. Kreuter, S. Gelperina // *International journal of pharmaceutics*. – 2017. – Vol. 524. – №. 1-2. – P. 77-90.
7. Maksimenko O. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development / O. Maksimenko, J. Malinovskaya, E. Shipulo, N. Osipova, V. Razzhivina, D. Arantseva, O. Yarovaya, U. Mostovaya, A. Khalansky, V. Fedoseeva, A. Alekseeva, L. Vanchugova, M. Gorshkova, E. Kovalenko, V. Balabanyan, P. Melnikov, V. Baklaushev, V. Chekhonin, J. Kreuter, S. Gelperina // *International journal of pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 572. – P. 118733.
8. Dimarco A. Experimental studies of the antineoplastic activity of a new antibiotic, daunomycin / A. Dimarco, M. Gaetani, L. Dorigotti, M. Soldati, O. Bellini // *Tumori*. – 1963. – Vol. 49. – P. 203.

9. Octavia Y. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies / Y. Octavia , C. G. Tocchetti, K. L. Gabrielson, S. Janssens, H. J. Crijns, A. L. Moens // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2012. – Vol. 52. – №. 6. – P. 1213-1225.
10. Šimůnek T. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron / T. Šimůnek, M. Stérba, O. Popelová, M. Adamcová, R. Hrdina, V. Gersl // *Pharmacological reports*. – 2009. – Vol. 61. – №. 1. – P. 154-171.
11. Frederick C. A. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin / C. A. Frederick, L. D. Williams, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich, A. H. Wang // *Biochemistry*. – 1990. – Vol. 29. – №. 10. – P. 2538-2549.
12. Chatterjee K. Doxorubicin cardiomyopathy / K. Chatterjee, J. Zhang, N. Honbo, J. S. Karliner // *Cardiology*. – 2010. – Vol. 115. – №. 2. – P. 155-162.
13. Outomuro D. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? / D. Outomuro, D. R. Grana, F. Azzato, J. Milei // *International journal of cardiology*. – 2007. – Vol. 117. – №. 1. – P. 6-15.
14. Raj S. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment / S. Raj, V. I. Franco, S. E. Lipshultz // *Current treatment options in cardiovascular medicine*. – 2014. – Vol. 16. – №. 6. – P. 315.
15. Geiger S. Anticancer therapy induced cardiotoxicity: review of the literature / S. Geiger, V. Lange, P. Suhl, V. Heinemann, H. J. Stemmler // *Anti-cancer drugs*. – 2010. – Vol. 21. – №. 6. – P. 578-590.
16. Гендлин Г. Е. Современный взгляд на кардиотоксичность химиотерапии онкологических заболеваний, включающей антрациклиновые антибиотики / Г. Е. Гендлин, Е. И. Емелина, И. Г. Никитин, Ю. А. Васюк // *Российский кардиологический журнал*. – 2017. – №. 3 (143). С. 145-154.
17. Minotti G. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity / G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni // *Pharmacological reviews*. – 2004. – Vol. 56. – №. 2. – P. 185-229.
18. Lopez-Berestein G. Liposomes in the therapy of infectious diseases and cancer / G. Lopez-Berestein, I. J. Fidler. – AR Liss, 1989.
19. Allen T. M. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications / T. M. Allen, P. R. Cullis // *Advanced drug delivery reviews*. – 2013. – Vol. 65. – №. 1. – P. 36-48.
20. Kreuter J. Nanoparticles—a historical perspective // *Int. Journal of Pharmaceutics*. – 2007. – Vol. 331. – №. 1. – P. 1-10.

21. Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 484–488.
22. Kreuter J. Nanoparticles. In: Swarbrick J., Boylan J.C. (Eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* // M. Dekker. – New York. – 1994. – Vol.10. – P. 165–190.
23. Auría-Soro C. Interactions of nanoparticles and biosystems: microenvironment of nanoparticles and biomolecules in nanomedicine / C. Auría-Soro, T. Nesma, P. Juanes-Velasco, A. Landeira-Viñuela, H. Fidalgo-Gomez, V. Acebes-Fernandez, R. Gongora, M. J. Almendral Parra, R. Manzano-Roman, M. Fuentes // *Nanomaterials.* – 2019. – Vol. 9. – №. 10. – P. 1365.
24. Sathish Sundar D. Recent trends of biocompatible and biodegradable nanoparticles in drug delivery: a review / D. S. Sundar, M. G. Antoniraj, C. S. Kumar, S. S. Mohapatra, N. N. Houreld, K. Ruckmani // *Current medicinal chemistry.* – 2016. – Vol. 23. – №. 32. – P. 3730-3751.
25. Гельперина С.Э. Разработка подходов к созданию лекарственных форм антибиотиков на основе полимерных наночастиц: Дис. ...докт. хим. наук: 03.01.06 / С.Э. Гельперина.– М., 2010. – 302 с.
26. Dang Y. Nanoparticle-based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy / Y. Dang, J. Guan // *Smart Materials in Medicine.* – 2020.
27. Akbarzadeh A. et al. Liposome: classification, preparation, and applications / A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S. W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki // *Nanoscale research letters.* – 2013. – Vol. 8, №. 1. – P. 102.
28. Ventola C. L. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs // *Pharmacy and Therapeutics.* – 2017. – Vol. 42. – №. 12. – P. 742.
29. Choi Y. H. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics / Y. H. Choi, H. K. Han // *Journal of Pharmaceutical Investigation.* – 2018. – Vol. 48. – №. 1. – P. 43-60.
30. Cheng J. Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery / J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad // *Biomaterials.* – 2007. – Vol. 28, №. 5. – P. 869-876.
31. Gu F. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers / F. Gu, L. Zhang, B. A. Teply, N. Mann, A. Wang, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 105, №. 7. – P. 2586-2591.

32. Bala I. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art / I. Bala, S. Hariharan, M. N. V. R. Kumar // *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. – 2004. – Vol. 21. – №. 5.
33. Elmowafy E. M. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly (lactic acid)/poly (lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles / E. M. Elmowafy, M. Tiboni, M. E. Soliman // *Journal of Pharmaceutical Investigation*. – 2019. – P. 1-34.
34. Ramot Y. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers / Y. Ramot, M. Haim-Zada, A. J. Domb, A. Nyska // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – Vol. 107. – P. 153-162.
35. Zhong H. A. comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products / H. Zhong, G. Chan, Y. Hu, H. Hu, D. A. Ouyang // *Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 10, №. 4. – P. 263.
36. Makadia H. K. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier / H. K. Makadia, S. J. Siegel // *Polymers*. – 2011. – Vol. 3. – №. 3. – P. 1377-1397.
37. Danhier F. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications / F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat // *Journal of controlled release*. – 2012. – Vol. 161, №. 2. – P. 505-522.
38. Wang Y. FDA's regulatory science program for generic PLA/PLGA-based drug products / Y. Wang, Q. Wen, S. Choi // *Am Pharm Rev*. – 2016. – Vol. 19, №. 4. – P. 5-9.
39. Qi F. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: a review in scientific and industrial aspects / F. Qi, J. Wu, H. Li, G. Ma // *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. – 2019. – Vol. 13. – №. 1. – P. 14-27.
40. Juliano R. L. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions // *Adv. Drug Deliv. Rev*. – 1988. – Vol. 2. – №. 1. – P. 31-54.
41. Owens III D. E. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles / D. E. Owens III, N. A. Peppas // *International journal of pharmaceutics*. – 2006. – Vol. 307. – №. 1. – P. 93-102.
42. Alexis F. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles / F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad // *Molecular pharmaceutics*. – 2008. – Vol. 5. – №. 4. – P. 505-515.
43. Obst K. Protein corona formation on colloidal polymeric nanoparticles and polymeric nanogels: impact on cellular uptake, toxicity, immunogenicity, and drug release properties / K. Obst, G. Yealland, B. Balzus, E. Miceli, M. Dimde, C. Weise, M. Eravci, R. Bodmeier, R. Haag, M. Calderón, N. Charbaji, S. Hedtrich // *Biomacromolecules*. – 2017. – Vol. 18. – №. 6. – P. 1762-1771.
44. Hillaireau H. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery / H. Hillaireau, P. Couvreur // *Cellular and molecular life sciences*. – 2009. – Vol. 66, №. 17. – P. 2873-2896.

45. Behzadi S. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell / S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, M. A. Hamaly, M. Y. Alkawareek, E. C. Dreaden, D. Brown, A. M. Alkilany, O. C. Farokhzad, M. Mahmoudi // *Chemical Society Reviews*. – 2017. – Vol. 46, № 14. – P. 4218-4244.
46. Carrstensen H. Particle size, surface hydrophobicity and interaction with serum of parenteral fat emulsions and model drug carriers as parameters related to RES uptake / H. Carrstensen, R. H. Mueller, B. W. Müller // *Clinical nutrition*. – 1992. – Vol. 11. – № 5. – P. 289-297.
47. Asadi A. Streptomycin-loaded PLGA-alginate nanoparticles: preparation, characterization, and assessment // *Appl Nanosci*. – 2014. – Vol. 4. – № 4. – P. 455-460.
48. Fattal E. Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles / E. Fattal, M. Youssef, P. Couvreur, A. Andremont // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1989. – Vol. 33. – № 9. – P. 1540-1543.
49. Imbuluzqueta E. Hydrophobic gentamicin-loaded nanoparticles are effective against *Brucella melitensis* infection in mice / E. Imbuluzqueta, C. Gamazo, H. Lana, M. Á. Campanero, D. Salas, A. G. Gil, E. Elizondo, N. Ventosa, J. Veciana, M. J. Blanco-Prieto // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – № 7. – P. 3326-3333.
50. Moghimi S. M. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties / S. M. Moghimi, J. Szebeni // *Prog. Lipid. Res.* – 2003. – Vol. 42 – № 6. – P. 463-478.
51. Gref R. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption / R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2000. – Vol. 18. – № 3-4. – P. 301-313.
52. Li S. D. Stealth nanoparticles: high density but sheddable PEG is a key for tumor targeting / S. D. Li, L. Huang // *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. – 2010. – Vol. 145. – № 3. – P. 178.
53. Dumortier G. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics / G. Dumortier, J. L. Grossiord, F. Agnely, J. C. Chaumeil // *Pharmaceutical research*. – 2006. – Vol. 23. – № 12. – P. 2709-2728.
54. Dunn S. E. In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly (lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers / S. E. Dunn, A. G. A. Coombes, M. C. Garnett, S. S. Davis, M. C. Davies, L. Illum // *J. Control. Release*. – 1997. – Vol. 44. – № 1. – P. 65-76.

55. Senapati S. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar, P. Maiti // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2018. – Vol. 3. – №. 1. – P. 1-19.
56. Hashizume H. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness / H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J.W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R. K. Jain, D. M. McDonald // *The American journal of pathology*. – 2000. – Vol. 156. – №. 4. – P. 1363-1380.
57. Maeda H. Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs / H. Maeda, Y. Matsumura // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 1988. – Vol. 6. – №. 3. – P. 193-210.
58. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect // *Advanced drug delivery reviews*. – 2011. – Vol. 63. – №. 3. – P. 131-135.
59. Immordino M. L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential / M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel // *Int. J. Nanomedicine*. – 2006. – Vol. 1. – №. 3. – P. 297-315.
60. Wilhelm S. Analysis of nanoparticle delivery to tumours / S. Wilhelm, A. J. Tavares, Qi. Dai, S. Ohta, J. Audet, H. F. Dvorak, W.C. W. Chan // *Nature reviews materials*. – 2016. – Vol. 1 – №. 5. – P. 1-12.
61. Bazak R. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature / R. Bazak, M. Hourri, S. El. Achy, S. Kamel, T. Refaat // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2015. – Vol. 141. – №. 5. – P. 769-784.
62. Muhamad N. Application of active targeting nanoparticle delivery system for chemotherapeutic drugs and traditional/herbal medicines in cancer therapy: a systematic review / N. Muhamad, T. Plengsuriyakarn, K. Na-Bangchang // *International journal of nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13. – P. 3921.
63. Byrne J. D. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics / J. D. Byrne, T. Betancourt, L. Brannon-Peppas // *Advanced drug delivery reviews*. – 2008. – Vol. 60. – №. 15. – P. 1615-1626.
64. Friedman A. The smart targeting of nanoparticles / A. Friedman, S. Claypool, R. Liu // *Current pharmaceutical design*. – 2013. – Vol. 19. – №. 35. – P. 6315-6329.
65. Nicolas J. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery / J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz, P. Couvreur // *Chemical Society Reviews*. – 2013. – Vol. 42. – №. 3. – P. 1147-1235.

66. Martens T. F. Intracellular delivery of nanomaterials: how to catch endosomal escape in the act / T. Martens, K. Remaut, J. Demeester, S. D. Smedt, K. Braeckmans // *Nano Today*. – 2014. – Vol. 9. – №. 3. – P. 344-364.
67. Rosenblum D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics / D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J. M. Karp, D. Peer // *Nature communications*. – 2018. – Vol. 9. – №. 1. – P. 1-12.
68. Maeda H. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo / H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang // *Advanced drug delivery reviews*. – 2013. – Vol. 65. – №. 1. – P. 71-79.
69. He H. Survey of Clinical Translation of Cancer Nanomedicines—Lessons Learned from Successes and Failures / H. He, L. Liu, E. E. Morin, M. Liu, A. Schwendeman // *Accounts of chemical research*. – 2019. – Vol. 52. – №. 9. – P. 2445-2461.
70. Rivera E. Liposomal anthracyclines in metastatic breast cancer: clinical update // *The oncologist*. – 2003. – Vol. 8. – №. 90002. – P. 3-9.
71. O'Brien M. E. R. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer / M. E. O'Brien, N. Wigler, M. Inbar, R. Rosso, E. Grischke, A. Santoro, R. Catane, D. G. Kieback, P. Tomczak, S. P. Ackland, F. Orlandi, L. Mellars, L. Alland, C. Tendler // *Annals of oncology*. – 2004. – Vol. 15. – №. 3. – P. 440-449.
72. Anders C. K. Pharmacokinetics and efficacy of PEGylated liposomal doxorubicin in an intracranial model of breast cancer / C. K. Anders, B. Adamo, O. Karginova, A. M. Deal, S. Rawal, D. Darr, A. Schorzman, C. Santos, R. Bash, T. Kafri, L. Carey, C. R. Miller, C. M. Perou, N. Sharpless, W. C. Zamboni // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – №. 5. – P. e61359.
73. Barenholz Y. C. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned // *Journal of controlled release*. – 2012. – Vol. 160. – №. 2. – P. 117-134.
74. Papahadjopoulos D. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy / D. Papahadjopoulos, T. M. Allen, A. Gabizon, E. Mayhew, K. Matthay, S. K. Huang, K. D. Lee, M. C. Woodle, D. D. Lasic, C. Redemann // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1991. – Vol. 88. – №. 24. – P. 11460-11464.
75. Lorusso D. Pegylated liposomal doxorubicin-related palmar-plantar erythrodysesthesia ('hand-foot' syndrome) / D. Lorusso, A. Di Stefano, V. Carone, A. Fagotti, S. Pisconti, G. Scambia // *Annals of oncology*. – 2007. – Vol. 18. – №. 7. – P. 1159-1164.
76. Gabizon A. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin / A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz // *Clinical pharmacokinetics*. – 2003. – Vol. 42. – №. 5. – P. 419-436.

77. Batist G. Myocet (liposome-encapsulated doxorubicin citrate): a new approach in breast cancer therapy / G. Batist, J. Barton, P. Chaikin, C. Swenson, L. Welles //Expert opinion on pharmacotherapy. – 2002. – Vol. 3. – №. 12. – P. 1739-1751.
78. Balazsovits J. A. E. Analysis of the effect of liposome encapsulation on the vesicant properties, acute and cardiac toxicities, and antitumor efficacy of doxorubicin / J. A. Balazsovits, L. D. Mayer, M. B. Bally, P. R. Cullis, M. McDonell, R. S. Ginsberg, R. E. Falk // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 1989. – Vol. 23. – №. 2. – P. 81-86.
79. Mayer L. D. Characterization of liposomal systems containing doxorubicin entrapped in response to pH gradients / L. D. Mayer, L. C. Tai, M. B. Bally, G. N. Mitilenes, R. S. Ginsberg, P. R. Cullis // Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes. – 1990. – T. 1025. – №. 2. – P. 143-151.
80. Leonard R. C. F. Improving the therapeutic index of anthracycline chemotherapy: focus on liposomal doxorubicin (Myocet™) / R. C. Leonard, S. Williams, A. Tulpule, A. M. Levine, S. Oliveros //The Breast. – 2009. – Vol. 18. – №. 4. – P. 218-224.
81. Swenson C. E. Liposome technology and the development of Myocet™(liposomal doxorubicin citrate) / C. E. Swenson, W. R. Perkins, P. Roberts, A. S. Janoff //The Breast. – 2001. – Vol. 10. – P. 1-7.
82. Luo R. Distinct biodistribution of doxorubicin and the altered dispositions mediated by different liposomal formulations / R. Luo, Y. Li, M. He, H. Zhang, H. Yuan, M. Johnson, M. Palmisano, S. Zhou, D. Sun // International journal of pharmaceutics. – 2017. – Vol. 519, №. 1-2. – P. 1-10.
83. Soundararajan A. [186Re] Liposomal doxorubicin (Doxil): in vitro stability, pharmacokinetics, imaging and biodistribution in a head and neck squamous cell carcinoma xenograft model / A. Soundararajan, A. Bao, W. T. Phillips, R. 3rd Perez, B. A. Goins // Nuclear medicine and biology. – 2009. – Vol. 36. – №. 5. – P. 515-524.
84. Bao A. Direct 99mTc labeling of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) for pharmacokinetic and non-invasive imaging studies / A. Bao, B. Goins, R. Klipper, G. Negrete, W. T. Phillips // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2004. – Vol. 308. – №. 2. – P. 419-425.
85. Bhowmik S. Two multicenter Phase I randomized trials to compare the bioequivalence and safety of a generic doxorubicin hydrochloride liposome injection with Doxil® or Caelyx® in advanced ovarian cancer / S. Bhowmik, S. Bhowmick, K. Maiti, A. Chakra, P. Shahi, D. Jain, T. Rajamannar //Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 2018. – Vol. 82. – №. 3. – P. 521-532.

86. Burade V. Comparative plasma and tissue distribution of Sun Pharma's generic doxorubicin HCl liposome injection versus Caelyx®(doxorubicin HCl liposome injection) in syngeneic fibrosarcoma-bearing BALB/c mice and Sprague–Dawley rats / V. Burade, S. Bhowmick, K. Maiti, R. Zalawadia, D. Jain, T. Rajamannar //Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 2017. – Vol. 79. – №. 5. – P. 899-913.
87. Mross K. Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors: an open-label, single-dose study / K. Mross, B. Niemann, U. Massing, J. Dreves, C. Unger, R. Bhamra, C. E. Swenson //Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2004. – Vol. 54. – №. 6. – P. 514-524.
88. Swenson C. E. Pharmacokinetics of doxorubicin administered iv as Myocet (TLC D-99; liposome-encapsulated doxorubicin citrate) compared with conventional doxorubicin when given in combination with cyclophosphamide in patients with metastatic breast cancer / C. E. Swenson, L.E. Bolcsak, G.Batist, T. H. Guthrie, K. H. Tkaczuk, H. Boxenbaum, L. Welles, S. Chow, R. Bhamra, P. Chaikin //Anti-cancer drugs. – 2003. – Vol. 14. – №. 3. – P. 239-246
89. Gabizon A. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethyleneglycol coated liposomes / A. Gabizon, R. Catane, B. Uziely, B. Kaufman, T. Safra, R. Cohen, F. Martin, A. Huang, Y. Barenholz //Cancer research. – 1994. – Vol. 54. – №. 4. – P. 987-992.
90. Lyass O. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma / O. Lyass, B. Uziely, R. Ben-Yosef, D. Tzemach, N. I. Heshing, M. Lotem, G. Brufman, A. Gabizon //Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. – 2000. – Vol. 89. – №. 5. – P. 1037-1047.
91. Rafiyath S. M. Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: a meta-analysis / S. M. Rafiyath, M. Rasul, B. Lee, G. Wei, G. Lamba, D. Liu //Experimental hematology & oncology. – 2012. – Vol. 1. – №. 1. – P. 10.
92. Danson S. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer / S. Danson, D. Ferry, V. Alakhov, J. Margison, D. Kerr, D. Jowle, M. Brampton, G. Halbert, M. Ranson //British journal of cancer. – 2004. – Vol. 90. – №. 11. – P. 2085-2091.
93. Dou Y. To heat or not to heat: Challenges with clinical translation of thermosensitive liposomes / Y. Dou, K. Hynynen, C. Allen // Journal of controlled release. – 2017. – Vol. 249. – P. 63-73.
94. Трещалин И. Д. Сравнительное экспериментальное токсикологическое исследование доксорубицина и его наносомальных лекарственных форм / И. Д. Трещалин, Э. Р.

- Переверзева, Д. А. Бодягин, М. И. Трещалин, О. О. Максименко, И. Кройтер, С. Э. Гельперина // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2008. . – Т. 7. . – № 3.
95. De Verdiere A. C. Reversion of multidrug resistance with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: towards a mechanism of action / A. C. de Verdière, C. Dubernet, F. Némati, E. Soma, M. Appel, J. Ferté, S. Bernard, F. Puisieux, P. Couvreur // *British journal of cancer*. – 1997. – Vol. 76. – №. 2. – P. 198.
96. Couvreur P. Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles / P. Couvreur, B. Kante, L. Grislain, M. Roland, P. Speiser // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1982. – Vol. 71. – №. 7. – P. 790-792.45.
97. Merle P. Phase 1 study of intra-arterial hepatic (IAH) delivery of doxorubicin-transdrug (DT) for patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) / P. Merle, S. Si Ahmed, F. Habersetzer, A. Abergel, J. Taieb, L. Bonyhay, D. Costantini, J. Dufour-Lamartinie, C. Trepo // *Journal of Clinical Oncology*. – 2006. – Vol. 24. – №. 18\_suppl. – P. 14094-14094.
98. Pharma B. Doxorubicin Transdrug®: Phase II //III [http://www. bioalliancepharma. com](http://www.bioalliancepharma.com) Assessed. – 2008. – Vol. 28.
99. Anselmo A. C. Nanoparticles in the clinic / A. C. Anselmo, S. Mitragotri // *Bioengineering & translational medicine*. – 2016. – Vol. 1. – №. 1. – P. 10-29.
100. Espelin C. W. Dual HER2 targeting with trastuzumab and liposomal-encapsulated doxorubicin (MM-302) demonstrates synergistic antitumor activity in breast and gastric cancer / C. W. Espelin, S. C. Leonard, E. Geretti, T. J. Wickham, B. S. Hendriks // *Cancer research*. – 2016. – Vol. 76, №. 6. – P. 1517-1527.
101. Bernacki J. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier / J. Bernacki, A. Dobrowolska, K. Nierwinska, A. Malecki // *Pharmacol Rep*. – 2008. – Vol. 60. – №5. – P. 600-22.
102. Sabeque A. J. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibitors / A.J. Sabeque, C. Wandel, H. He // *Clin. Pharmacol. Ther*. – 2000. – Vol. 68. – P. 231–237.
103. Abbott N. J. Structure and function of the blood–brain barrier / N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof, D. J. Begley // *Neurobiology of disease*. – 2010. – Vol. 37. – №. 1. – P. 13-25.
104. Masserini M. Nanoparticles for brain drug delivery // *ISRN biochemistry*. – 2013. – Vol. 2013.
105. Fisusi F. A., Schätzlein A. G., Uchegbu I. F. Nanomedicines in the treatment of brain tumors / F. A. Fisusi, A. G. Schätzlein, I. F. Uchegbu. – 2018.
106. Mahmoud B. S. Polymeric Nanoparticles for the Treatment of Malignant Gliomas / B. S. Mahmoud, A. H. AlAmri, C. McConville // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – №. 1. – P. 175.

107. Cheo S. T. T. Glioblastoma multiforme outcomes of 107 patients treated in two Singapore institutions / S. T. T. Cheo, G. H. Lim, K. H. C. Lim // Singapore medical journal. – 2017. – Vol. 58. – №. 1. – P. 41.
108. Voulgaris S. Intratumoral doxorubicin in patients with malignant brain gliomas / S. Voulgaris, M. Partheni, M. Karamouzis, P. Dimopoulos, N. Papadakis, H. P. Kalofonos // American journal of clinical oncology. – 2002. – Vol. 25. – №. 1. – P. 60-64.
109. Tomita T. Interstitial chemotherapy for brain tumors // Journal of neuro-oncology. – 1991. – Vol. 10. – №. 1. – P. 57-74.
110. Von Holst H. Uptake of adriamycin in tumour and surrounding brain tissue in patients with malignant gliomas / H. von Holst, E. Knochenhauer, H. Blomgren, V. P. Collins, L. Ehn, M. Lindquist, G. Norén, C. Peterson // Acta neurochirurgica. – 1990. – Vol. 104. – №. 1-2. – P. 13-16.
111. Brandsma D. P08. 03 2B3-101, Glutathione PEGylated liposomal doxorubicin in patients with recurrent high grade gliomas and breast cancer brain metastases / D. Brandsma, V. Dieras, S. Altintas, C. Anders, M. Arnedos, H. Gelderblom, P. Soetekouw, A. Jager, M. van Linde, and P. Aftimos // Neuro-oncology. – 2014. – T. 16. – №. suppl\_2. – C. ii50-ii51.
112. Whittle J. R. First in human nanotechnology doxorubicin delivery system to target epidermal growth factor receptors in recurrent glioblastoma / J. R. Whittle, J. D. Lickliter, H. K. Gan, A. M. Scott, J. Simes, B. J. Solomon, J. A. MacDiarmid, H. Brahmabhatt, M. A. Rosenthal // Journal of Clinical Neuroscience. – 2015. – Vol. 22. – №. 12. – P. 1889-1894.
113. Siegal T. Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes for the treatment of a brain tumor model: biodistribution and therapeutic efficacy / T. Siegal, A. Horowitz, A. Gabizon // Journal of neurosurgery. – 1995. – Vol. 83. – №. 6. – P. 1029-1037.
114. Sharma U. S. Liposome-mediated therapy of intracranial brain tumors in a rat model / U. S. Sharma, A. Sharma, R. I. Chau, R. M. Straubinger // Pharmaceutical research. – 1997. – Vol. 14. – №. 8. – P. 992-998.
115. Chastagner P. Preclinical studies of pegylated-and non-pegylated liposomal forms of doxorubicin as radiosensitizer on orthotopic high-grade glioma xenografts / P. Chastagner, H. Sudour, J. Mriouah, M. Barberi-Heyob, V. Bernier-Chastagner, S. Pinel // Pharmaceutical research. – 2015. – Vol. 32. – №. 1. – P. 158-166.
116. Drummond D. C. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors / D. C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D. B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos // Pharmacological reviews. – 1999. – Vol. 51. – №. 4. – P. 691-744.

117. Abraham S. A. The liposomal formulation of doxorubicin / S. A. Abraham, D. N. Waterhouse, L. D. Mayer, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. B. Bally // *Methods in enzymology*. – Academic Press, 2005. – Vol. 391. – P. 71-97.
118. Battaglia L. Solid lipid nanoparticles for potential doxorubicin delivery in glioblastoma treatment: preliminary in vitro studies / L. Battaglia, M. Gallarate, E. Peira, D. Chirio, E. Muntoni, E. Biasibetti, M. T. Capucchio, A. Valazza, P. P. Panciani, M. Lanotte, D. Schiffer, L. Annovazzi, V. Caldera, M. Mellai, C. Riganti // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2014. – Vol. 103. – №. 7. – P. 2157-2165.
119. Kreuter J. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles) / J. Kreuter, R. N. Alyautdin, D. A. Kharkevich, A. A. Ivanov // *Brain research*. – 1995. – Vol. 674. – №. 1. – P. 171-174.
120. Alyautdin R. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles / R. Alyautdin, D. Gothier, V. Petrov, D. Kharkevich, J. Kreuter // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 1995. – Vol. 41. – №. 1. – P. 44-48.
121. Alyautdin R. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles / R. N. Alyautdin, V. E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D. A. Kharkevich, J. Kreuter // *Pharm. Res.* – 1997. – Vol. 14. – №. 3. – P. 325-328.
122. Liu H. In vitro release performance and analgesic activity of endomorphin-1 loaded nanoparticles / H. Liu, J. Ni, R. Wang // *Pharmazie*. – 2006. – Vol. 61. – №. 5. – P. 450-452.
123. Vilella A. Endocytosis of nanomedicines: the case of glycopeptide engineered PLGA nanoparticles / A. Vilella, B. Ruozi, D. Belletti, F. Pederzoli, M. Galliani, V. Semeghini, F. Forni, M. Zoli, M. A. Vandelli, G. Tosi // *Pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 7. – №. 2. – P. 74-89.
124. Pulgar V. M. Transcytosis to cross the blood brain barrier, new advancements and challenges // *Frontiers in neuroscience*. – 2019. – Vol. 12. – P. 1019.
125. Craparo E.F. Nanoparticulate systems for drug delivery and targeting to the central nervous system / E.F. Craparo, M. L. Bondi, G. Pitarresi, G. Cavallaro // *CNS Neurosci. Ther.* – 2011. – Vol. 17. – P. 670–677.
126. Friese A. Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly (butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system / A. Friese, E. Seiller, G. Quack, B. Lorenz, J. Kreuter // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2000. – Vol. 49. – №. 2. – P. 103-109.
127. Trapani A. Methotrexate-loaded chitosan-and glycolchitosan-based nanoparticles: a promising strategy for the administration of the anticancer drug to brain tumors / A. Trapani,

- N. Denora, G. Iacobellis, J. Sitterberg, U. Bakowsky, T. Kissel // *AAPS Pharm. Sci. Technol.* – 2011. – Vol. 12. – №. 4. – P. 1302-1311.
128. Басел А. А. Транспорт прозерина в головной мозг при помощи поли (бутил) циано-акрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом-80 / А. А. Басел, В. Е. Петров, В. Ю. Балабаньян, С. Э. Гельперина, С. С. Трофимов, Т. А. Воронила, Р. Н. Аляутдин // *Рос. мед. журн.* – 2006. – №. 4. – С. 28-32.
129. Wilson B. Design and evaluation of chitosan nanoparticles as novel drug carrier for the delivery of rivastigmine to treat Alzheimer's disease / B. Wilson, M. K. Samanta, M. S. Muthu, G. Vinothapooshan // *Ther. Deliv.* – 2011. – Vol. 2. – №. 5. –P. 599-609.
130. Darius J. Influence of nanoparticles on the brain-to-serum distribution and the metabolism of valproic acid in mice / J. Darius, F. P. Meyer, B. A. Sabel, U. Schroeder // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 52. – №. 9. – P. 1043-1047.
131. Gulyaev A. E. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles / A. E. Gulyaev, S. E. Gelperina, I. N. Skidan, A. S. Antropov, G. Y. Kivman, J. Kreuter // *Pharmaceutical research.* – 1999. – Vol. 16, №. 10. – P. 1564-1569.
132. Petri B. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants / B. Petri, A. Bootz, A. Khalansky, T. Hekmatara, R. Müller, R. Uhl, J. Kreuter, S. Gelperina // *J. Control. Release* 2007. – Vol. 117. – P. 51–58.
133. Borchard G. Uptake of surfactant-coated poly (methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers / G. Borchard, K. L. Audus, F. Shi, J. Kreuter // *International journal of pharmaceutics.* – 1994. – T. 110. – №. 1. – С. 29-35.
134. Tröster S. D., Müller U., Kreuter J. Modification of the body distribution of poly (methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants / S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter // *International Journal of Pharmaceutics.* – 1990. – Vol. 61. – №. 1-2. – P. 85-100.
135. Venne A. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells / A. Venne, S. Li, R. Mandeville, A. Kabanov, V. Alakhov // *Cancer research.* – 1996. – Vol. 56. – №. 16. – P. 3626-3629.
136. Batrakova E. V. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion / E. V. Batrakova, S. Li, W. F. Elmquist, D. W. Miller, V. Y. Alakhov, A. V. Kabanov // *British journal of cancer.* – 2001. – T. 85. – №. 12. – С. 1987.

137. Pardridge W. Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 494–500.
138. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases // *Neurobiology of disease.* – 2010. – Vol. 37, №. 1. – P. 48-57.
139. Clark A. J. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core / A. J. Clark, M. E. Davis // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2015. – Vol. 112, №. 40. – P. 12486-12491.
140. Кувачева Н. В. Проницаемость гематоэнцефалического барьера в норме, при нарушении развития головного мозга и нейродегенерации / Н. В. Кувачева, А. Б. Салмина, Ю. К. Комлева, Н. А. Малиновская, А. В. Моргун, Е. А. Пожиленкова, Г. С. Замай, Н. А. Язуина, М. М. Петрова // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова.* – 2013. – Т. 113. – №. 4. – С. 80-85.
141. Feczko T. Stimulating brain recovery after stroke using theranostic albumin nanocarriers loaded with nerve growth factor in combination therapy / T. Feczko, A. Piiper, S. Ansar, F.W. Blixt, M. Ashtikar, S. Schiffmann, T. Ulshöfer, M.J. Parnham, Y. Harel, L.L. Israel, J.P. Lellouche, M.G. Wacker // *Journal of Controlled Release.* – 2019. – Vol. 293. – P. 63-72.
142. Salvalaio M. Targeted polymeric nanoparticles for brain delivery of high molecular weight molecules in lysosomal storage disorders / M. Salvalaio, L. Rigon, D. Belletti, F. D'Avanzo, F. Pederzoli, B. Ruozi, O. Marin, M.A. Vandelli, F. Forni, M. Scarpa, R. Tomanin, G. Tosi // *PloS one.* – 2016. – Vol. 11. – №. 5. – С. e0156452.
143. Ganipineni L. P. Drug delivery challenges and future of chemotherapeutic nanomedicine for glioblastoma treatment / L. P. Ganipineni, F. Danhier, V. Pr at // *Journal of controlled release.* – 2018. – Vol. 281. – P. 42-57.
144. Kim S. S. Effective treatment of glioblastoma requires crossing the blood–brain barrier and targeting tumors including cancer stem cells: the promise of nanomedicine / S. S. Kim, J. B. Harford, K. F. Pirollo, E. H. Chang // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2015. – Vol. 468. – №. 3. – P. 485-489.
145. Geldenhuys W. Brain-targeted delivery of doxorubicin using glutathione-coated nanoparticles for brain cancers / W. Geldenhuys, D. Wehrung, A. Groshev, A. Hirani, V. Sutariya // *Pharmaceutical development and technology.* – 2015. – Vol. 20. – №. 4. – P. 497-506.
146. Kreuter J. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier / J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov, P. Ramge, K. Cychutek, C. Koch-Brandt, R. Alyautdin // *Journal of drug targeting.* – 2002. – Vol. 10. – №. 4. – P. 317-325.

147. Steiniger S. C. J. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles / S.C. Steiniger, J. Kreuter, A.S. Khalansky, I.N. Skidan, A.I. Bobruskin, Z.S. Smirnova, S.E. Severin, R. Uhl, M. Kock, K.D. Geiger, S.E. Gelperina //International Journal of Cancer. – 2004. – Vol. 109. – №. 5. – P. 759-767.
148. Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? //Advanced drug delivery reviews. – 2014. – Vol. 71. – P.2-14.
149. Zensi A. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones / A. Zensi, D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, S. Wagner, C. Büchel, H. von Briesen, J. Kreuter //Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. – 2009. – Vol. 137. – №. 1. – P. 78-86.
150. Zensi A. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein AI cross the blood-brain barrier and enter the rodent brain / A. Zensi, D. Begley, C. Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, C. Büchel, J. Kreuter //Journal of drug targeting. – 2010. – Vol. 18. – №. 10. – P. 842-848.
151. Pereverzeva E. Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats / E. Pereverzeva, I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, J. Kreuter, S. Gelperina //Toxicology letters. – 2008. – Vol. 178. – №. 1. – P. 9-19.
152. de Azevedo C. R. Modeling of the burst release from PLGA micro- and nanoparticles as function of physicochemical parameters and formulation characteristics / C. Rodrigues de Azevedo, M. von Stosch, M.S. Costa, A.M. Ramos, M.M. Cardoso, F. Danhier, V. Pr at, R. Oliveira //International journal of pharmaceutics. – 2017. – Vol. 532. – №. 1. – P. 229-240.
153. Janas C. The dispersion releaser technology is an effective method for testing drug release from nanosized drug carriers / C. Janas, M.P. Mast, L. Kirsamer, C. Angioni, F. Gao, W. M antele, J. Dressman, M.G. Wacker //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2017. – Vol. 115. – P. 73-83.
154. Bobo D. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date / D. Bobo, K. J. Robinson, J. Islam, K. J. Thurecht, S. R. Corrie // Pharmaceutical research. – 2016. – Vol. 33, №. 10. – P. 2373-2387.
155. Kapoor M. Liposomal drug product development and quality: current US experience and perspective / M. Kapoor, S. L. Lee, K. M. Tyner //The AAPS journal. – 2017. – Vol. 19, №. 3. – P. 632-641.
156. Rodallec A. Pharmacokinetics variability: Why nanoparticles are not just magic-bullets in oncology / A. Rodallec, S. Benzekry, B. Lacarelle, J. Ciccolini, R. Fanciullino //Critical reviews in oncology/hematology. – 2018. – Vol. 129, P. 1-12.

157. Wang W. Predicting nano–bio interactions by integrating nanoparticle libraries and quantitative nanostructure activity relationship modeling / W. Wang, A. Sedykh, H. Sun, L. Zhao, D.P. Russo, H. Zhou, B. Yan, H. Zhu //ACS nano. – 2017. – Vol. 11, №. 12. – P. 12641-12649.
158. FDA U. S. Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials – Guidance for Industry // Silver Spring, MD: US Department of Health and Human Services. 2017.
159. Rockville M. FDA Guidance for Industry: extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlation. – 1997.
160. Andhariya J. V. Development of Level A in vitro-in vivo correlations for peptide loaded PLGA microspheres / J. V. Andhariya, R. Jog, J. Shen, S. Choi, Y. Wang, Y. Zou, D. J. Burgess // Journal of Controlled Release. – 2019.
161. Zhu C. Formation Mechanism, In vitro and In vivo Evaluation of Dimpled Exenatide Loaded PLGA Microparticles Prepared by Ultra-Fine Particle Processing System / C. Zhu, T. Peng, D. Huang, D. Feng, X. Wang, X. Pan, W. Tan, C. Wu //AAPS PharmSciTech. – 2019. – Vol. 20. – №. 2. – P. 64.
162. Park C. W. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of PLGA microspheres containing norquetiapine for long-acting injection / C.W. Park, H.J. Lee, D.W. Oh, J.H. Kang, C.S. Han, D.W. Kim //Drug design, development and therapy. – 2018. – Vol. 12. – P. 711.
163. Warnken Z. In Vitro–In Vivo Correlations of Carbamazepine Nanodispersions for Application in Formulation Development / Z. Warnken, M. Puppolo, J. Hughey, I. Duarte, S. Jansen-Varnum //Journal of pharmaceutical sciences. – 2018. – Vol. 107. – №. 1. – P. 453-465.
164. Singh G. Atazanavir-loaded Eudragit RL 100 nanoparticles to improve oral bioavailability: optimization and in vitro/in vivo appraisal / G. Singh, R. S. Pai // Drug delivery. – 2016. – Vol. 23. – №. 2. – P. 532-539.
165. Nothnagel L. How to measure release from nanosized carriers? / L. Nothnagel, M. G. Wacker // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Vol. 120. – P. 199-211.
166. Jung F. A comparison of two biorelevant in vitro drug release methods for nanotherapeutics based on advanced physiologically-based pharmacokinetic modelling / F. Jung, L. Nothnagel, F. Gao, M. Thurn, V. Vogel, M.G. Wacker //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2018. – Vol. 127. – P. 462-470.
167. Kim D. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents / D. Kim, H. El-Shall, D. Dennis, T. Morey //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2005. – Vol. 40, №. 4. – P. 83-91.

168. He C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles / C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. – №. 13. – P. 3657-3666.
169. <https://ncl.cancer.gov/working-ncl/process-overview#a>; Дата обращения: 19 августа 2020.
170. Sharman D. C. Determination of lactic acid and poly (lactic acid) s in a dermatological formulation by capillary electrophoresis // *Analyst*. – 1997. – Vol. 122. – №. 7. – P. 709-713.
171. Joshi D. P. Determination of poly (vinyl alcohol) via its complex with boric acid and iodine / D. P. Joshi, Y. L. Lan-Chun-Fung, J. G. Pritchard // *Analytica Chimica Acta*. – 1979. – Vol. 104. – №. 1. – P. 153-160.
172. Nagpal S. A physiologically-based nanocarrier biopharmaceutics model to reverse-engineer the in vivo drug release / S. Nagpal, S. Braner, H. Modh, A.X.X. Tan, M.P. Mast, K. Chichakly, V. Albrecht, M.G. Wacker // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2020. – Vol. 153. – P. 257-272.
173. Barzegar-Jalali M. Reciprocal powered time model for release kinetic analysis of ibuprofen solid dispersions in oleaster powder, microcrystalline cellulose and crospovidone / G. Mohammadi, M. Barzegar-Jalali, H. Valizadeh, H. Nazemiyeh, A. Barzegar-Jalali, M.R. Siah Shadbad, K. Adibkia, M. Zare // *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. – 2010. – Vol. 13, №. 2. – P. 152-161.
174. Nothnagel L. Predictive PBPK modeling as a tool in the formulation of the drug candidate TMP-001 / L. Nothnagel, F. Jung, T. Rossmanith, M. Thurn, M. Ashtikar, G. Geisslinger, M.J. Parnham, M.G. Wacker // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2019. – Vol. 134. – P. 144-152.
175. Kenley R. A. Poly (lactide-co-glycolide) decomposition kinetics in vivo and in vitro / R. A. Kenley, M. O. Lee, T. R. Mahoney, L. M. Sanders // *Macromolecules*. – 1987. – Vol. 20. – №. 10. – P. 2398-2403.
176. Heron M. W. A method for measuring a nonionic surface-active agent (Pluronic F-68) in biological fluids / M. W. Heron, B. C. Paton // *Analytical biochemistry*. – 1968. – Vol. 24, №. 3. – P. 491-495.
177. Fornaguera C. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies / C. Fornaguera, G. Calderó, M. Mitjans, M. P. Vinardell, C. Solans, C. Vauthier // *Nanoscale*. – 2015. – Vol. 7. – №. 14. – P. 6045-6058.
178. Yu S. A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug

- discovery / S. Yu, S. Li, H. Yang, F. Lee, J. T. Wu, M. G. Qian // *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*. – 2005. – Vol. 19. – №. 2. – P. 250-254.
179. Фирсов А. А. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств / А. А. Фирсов, В. П. Жердев, Ю. А. Портной, Г. Б. Колыванов, А. А. Литвин, Е. Ю. Барманова // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. АН Миронова*. Изд. М.: Гриф и К. – 2012. – С. 845-855.
180. Lee H. B. Blood volume in the rat / H. B. Lee, M. D. Blafox // *Journal of Nuclear Medicine*. – 1985. – Vol. 26. – №. 1. – P. 72-76.
181. Rafiei P. Docetaxel-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles for intravenous application: pharmacokinetics and biodistribution profile / P. Rafiei, A. Haddadi // *International journal of nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 935.
182. Bian X. Development of PLGA-based itraconazole injectable nanospheres for sustained release / X. Bian, S. Liang, J. John, C. H. Hsiao, X. Wei, D. Liang, H. Xie // *International journal of nanomedicine*. – 2013. – Vol. 8. – P. 4521.
183. D'Mello S. R. The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States / S. R. D'Mello, C. N. Cruz, M. L. Chen, M. Kapoor, S. L. Lee, K. M. Tyner // *Nature Nanotechnology*. – 2017. – Vol. 12. – №. 6. – P. 523-529.
184. Halamoda-Kenzaoui B. Mapping of the available standards against the regulatory needs for nanomedicines / B. Halamoda-Kenzaoui, U. Holzwarth, G. Roebben, A. Bogni, S. Bremer-Hoffmann // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2019. – Vol. 11. – №. 1. – P. e1531.
185. Bremer-Hoffmann S. Identification of regulatory needs for nanomedicines / S. Bremer-Hoffmann, B. Halamoda-Kenzaoui, S. E. Borgos // *Journal of Interdisciplinary Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 3. – №. 1. – P. 4-15.
186. Linsinger T. Requirements on measurements the European Commission definition of the term “nanomaterial”/ T. Linsinger, G. Roebben, D. Gilliland, L. Calzolari, F. Rossi, N. Gibson, C. Klein – 2012.
187. Joint MHLW-EMA Reflection Paper on the Development of Block Copolymer Micelle Medicinal Products. Reference Number EMA/CHMP/130299/2013, <https://www.ema.europa.eu/development-block-copolymer-micelle-medicinalproducts>; Дата обращения: 19 августа 2020.
188. Reflection Paper on the Data Requirements for Intravenous Iron-Based Nano-Colloidal Products Developed with Reference to an Innovator Medicinal Product. EMA Reference

Number EMA/CHMP/SWP/620008/2012, <https://www.ema.europa.eu/en/data-requirements-intravenous-iron-based-nano-colloidal-productsdeveloped-reference-innovator>; Дата обращения: 19 августа 2020.

189. Reflection Paper on the Data Requirements for Intravenous Liposomal Products Developed with Reference to an Innovator Liposomal Product. EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02, [https://www.ema.europa.eu/documents/scientificguideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-liposomal-productsdeveloped-reference-innovator\\_en-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientificguideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-liposomal-productsdeveloped-reference-innovator_en-0.pdf); Дата обращения: 19 августа 2020.
190. Caputo F. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity / F. Caputo, J. Clogston, L. Calzolari, M. Rösslein, A. Prina-Mello // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Vol. 299. – P. 31-43.
191. Varenne F. Multimodal dispersion of nanoparticles: a comprehensive evaluation of size distribution with 9 size measurement methods / F. Varenne, A. Makky, M. Gaucher-Delmas, F. Violleau, C. Vauthier // *Pharmaceutical research*. – 2016. – Vol. 33. – №. 5. – P. 1220-1234.
192. Gioria S. Are existing standard methods suitable for the evaluation of nanomedicines: some case studies / S. Gioria, F. Caputo, P. Urbán, C.M. Maguire, S. Bremer-Hoffmann, A. Prina-Mello, L. Calzolari, D. Mehn // *Nanomedicine*. – 2018. – Vol. 13. – №. 5. – P. 539-554.
193. Santander-Ortega M. J. Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: A variety of stabilisation mechanisms / M. J. Santander-Ortega, A. B. Jódar-Reyes, N. Csaba, D. Bastos-González, J. L. Ortega-Vinuesa // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2006. – Vol. 302. – №. 2. – P. 522-529.
194. Riina H. A. Superselective intraarterial cerebral infusion of bevacizumab: a revival of interventional neuro-oncology for malignant glioma / H. A. Riina, J. F. Fraser, S. Fralin, J. Knopman, R. J. Scheff, J. A. Boockvar // *J Exp Ther Oncol*. – 2009. – Vol. 8. – №. 2. – P. 145-150.
195. Miyagami M. Intra-arterial ACNU chemotherapy employing 20% mannitol osmotic blood-brain barrier disruption for malignant brain tumors / M. Miyagami, T. Tsubokawa, M. Tazoe, Y. Kagawa // *Neurologia medico-chirurgica*. – 1990. – Vol. 30. – №. 8. – P. 582-590.
196. Esquenazi Y. Critical care management of cerebral edema in brain tumors / Y. Esquenazi, V. P. Lo, K. Lee // *Journal of intensive care medicine*. – 2017. – Vol. 32. – №. 1. – P. 15-24.
197. Inoue T. Hyperosmotic blood-brain barrier disruption in brains of rats with an intracerebrally transplanted RG-C6 tumor / T. Inoue, M. Fukui, S. Nishio, K. Kitamura, H.

- Nagara //Journal of neurosurgery. – 1987. – Vol. 66. – №. 2. – P. 256-263.
198. Iwadate Y. Intra-arterial mannitol infusion in the chemotherapy for malignant brain tumors / Y. Iwadate, H. Namba, T. Saegusa, K. Sueyoshi //Journal of neuro-oncology. – 1993. – Vol. 15. – №. 2. – P. 185-193.
199. Chen K. B. Intravenous mannitol does not increase blood–brain barrier permeability to inert dyes in the adult rat forebrain / K.B. Chen, V.C. Wei, L.F. Yen, K.S. Poon, Y.C. Liu, K.S. Cheng, C.S. Chang, T.W. Lai //Neuroreport. – 2013. – Vol. 24. – №. 6. – P. 303-307.
200. Bootz A. Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles / A. Bootz, V. Vogel, D. Schubert, J. Kreuter //European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2004. – Vol. 57. – №. 2. –P. 369-375.
201. Ковшова Т. С. Оптимизация методов оценки степени включения доксорубина в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) / Т.С. Ковшова, Н.С. Осипова, А.С. Фортуна, Ю.В. Ермоленко, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина //Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – №. 2. – С. 113-118.
202. Liu Z. Evaluation of the efficacy of paclitaxel with curcumin combination in ovarian cancer cells / Z. Liu, Y. Y. Zhu, Z. Y. Li, S. Q. Ning //Oncology letters. – 2016. – Vol. 12. – №. 5. – P. 3944-3948.
203. Wallace S. J. Drug release from nanomedicines: selection of appropriate encapsulation and release methodology / S. J. Wallace, J. Li, R. L. Nation, B. J. Boyd //Drug delivery and translational research. – 2012. – Vol. 2. – №. 4. – P. 284-292.
204. Beck P. Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration / P. Beck, D. Scherer, J. Kreuter //Journal of microencapsulation. – 1990. – Vol. 7. – №. 4. – P. 491-496.
205. Zheng Y. Preparation, characterization, and drug release in vitro of chitosan-glycyrrhetic acid nanoparticles / Y. Zheng, Y. Wu, W. Yang, C. Wang, S. Fu, X. Shen //Journal of pharmaceutical sciences. – 2006. – Vol. 95. – №. 1. – P. 181-191.
206. Fülöp Z. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment / Z. Fülöp, R. Gref, T. Loftsson // International journal of Pharmaceutics. – 2013. – Vol. 454. – №. 1. – P. 559-561.
207. Tewes F. Comparative study of doxorubicin-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods / F. Tewes, E. Munnier, B. Antoon, L. Ngaboni Okassa, S. Cohen-Jonathan, H. Marchais, L. Douziech-Eyrolles, M.

- Soucé, P. Dubois, I. Chourpa //European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2007. – Vol. 66. – №. 3. – P. 488-492.
208. Ruyschaert T. Liposome retention in size exclusion chromatography / T. Ruyschaert, A. Marque, J. L. Duteyrat, S. Lesieur, M. Winterhalter, D. Fournier // BMC biotechnology. – 2005. – Vol. 5. – №. 1. – Vol. 1-13.
209. Scholes P. D. The preparation of sub-200 nm poly (lactide-co-glycolide) microspheres for site-specific drug delivery / P. D. Scholes, A. G. A. Coombes, L. Illum, S. S. Daviz, M. Vert, M. C. Davies // Journal of controlled release. – 1993. – Vol. 25. – №. 1-2. – P. 145-153.
210. Zambaux M. F. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method / M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron //Journal of Controlled Release. – 1998. – Vol. 50. – №. 1-3. – P. 31-40.
211. Carrio A. Preparation and degradation of surfactant-free PLGA microspheres / A. Carrio, G. Schwach, J. Coudane, M. Vert //Journal of controlled release. – 1995. – Vol. 37. – №. 1-2. – P. 113-121.
212. Sahoo S. K. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake / S. K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar //Journal of controlled release. – 2002. – Vol. 82. – №. 1. – P. 105-114.
213. Abdelwahed W. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations / W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi //Advanced drug delivery reviews. – 2006. – Vol. 58. – №. 15. – P. 1688-1713.
214. Fonte P. Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery / P. Fonte, S. Reis, B. Sarmiento // Journal of controlled release. – 2016. – Vol. 225. – P. 75-86.
215. Mittal G. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo / G. Mittal, D. K. Sahana, V. Bhardwaj, M. R. Kumar // Journal of Controlled Release. – 2007. – Vol. 119. – №. 1. – P. 77-85.
216. Beijnen J. H. Aspects of the degradation kinetics of doxorubicin in aqueous solution / J. H. Beijnen, O. Van der Houwen, W. J. M. Underberg //International journal of pharmaceutics. – 1986. – Vol. 32. – №. 2-3. – P. 123-131.
217. Andersen A. A sensitive and simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxorubicin and its metabolites in plasma / A. Andersen, D. J. Warren, L. Slørdal // Therapeutic drug monitoring. – 1993. – Vol. 15. – №. 5. – P. 455-461.

218. Beijnen J. H. HPLC determination of doxorubicin, doxorubicinol and four aglycone metabolites in plasma of AIDS patients / J. H. Beijnen, P. L. Meenhorst, R. Van Gijn, M. Fromme, H. Rosing, W. J. M. Underberg // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. – 1991. – Vol. 9. – №. 10-12. – P. 995-1002.
219. de Bruijn P. Determination of doxorubicin and doxorubicinol in plasma of cancer patients by high-performance liquid chromatography / P. de Bruijn, J. Verweij, W.J. Loos, H.J. Kolker, A.S. Planting, K. Nooter, G. Stoter, A. Sparreboom // *Analytical biochemistry*. – 1999. – Vol. 266. – №. 2. – P. 216-221.
220. Gray V. In Vitro Release Test Methods for Drug Formulations for Parenteral Applications / V. Gray, S. Cady, David Curran, J. Demuth, Okponanabofa Eradiri, M. Hussain, J. Kraemer, John G. Shabushnig, Erika S. Stippler // *Dissolution Technologies*. – 2018. – Vol. 25. – №. 4. – P. 8-13.
221. Balzus B. Comparison of different in vitro release methods used to investigate nanocarriers intended for dermal application / B. Balzus, M. Colombo, F. F. Sahle, G. Zoubari, S. Staufenbiel, R. Bodmeier // *International journal of pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 513. – №. 1-2. – P. 247-254.
222. Larsen C. Role of in vitro release models in formulation development and quality control of parenteral depots / C. Larsen, S. W. Larsen, H. Jensen, A. Yaghmur, J. Østergaard // *Expert opinion on drug delivery*. – 2009. – Vol. 6. – №. 12. – P. 1283-1295.
223. Magalhaes N. S. S. An in vitro release kinetic examination and comparative evaluation between submicron emulsion and polylactic acid nanocapsules of clofibrade / N. S. Magalhaes, H. Fessi, F. Puisieux, S. Benita, M. Seiller // *Journal of microencapsulation*. – 1995. – Vol. 12. – №. 2. – P. 195-205.
224. Magenheimer B. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers-ultrafiltration technique at low pressure / B. Magenheimer, M. Y. Levy, S. Benita // *International journal of pharmaceutics*. – 1993. – Vol. 94. – №. 1-3. – P. 115-123.
225. Chidambaram N. A novel in vitro release method for submicron-sized dispersed systems / N. Chidambaram, D. J. Burgess // *AAPS PharmSci*. – 1999. – Vol. 1. – №. 3. – P. 32-40.
226. Bohrey S. Polymeric nanoparticles containing diazepam: preparation, optimization, characterization, in-vitro drug release and release kinetic study / S. Bohrey, V. Chourasiya, A. Pandey // *Nano Convergence*. – 2016. – Vol. 3. – №. 1. – P. 1-7.
227. Dugyala V. R. Role of electrostatic interactions in the adsorption kinetics of nanoparticles at fluid–fluid interfaces / V. R. Dugyala, J. S. Muthukuru, E. Mani, M. G. Basavaraj // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2016. – Vol. 18. – №. 7. – P. 5499-5508.

228. Bizmark N. Effects of ionic strength on the colloidal stability and interfacial assembly of hydrophobic ethyl cellulose nanoparticles / N. Bizmark, M. A. Ioannidis // *Langmuir*. – 2015. – Vol. 31. – №. 34. – P. 9282-9289.
229. Lucero-Acuña A. Mathematical modeling and parametrical analysis of the temperature dependency of control drug release from biodegradable nanoparticles / A. Lucero-Acuña, C. A. Gutiérrez-Valenzuela, R. Esquivel, R. Guzmán-Zamudio // *RSC advances*. – 2019. – Vol. 9. – №. 16. – P. 8728-8739.
230. Xu X. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes / X. Xu, M. A. Khan, D. J. Burgess // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2012. – Vol. 426. – №. 1-2. – P. 211-218.
231. Shen J. In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: recent developments and challenges / J. Shen, D. J. Burgess // *Drug delivery and translational research*. – 2013. – Vol. 3. – №. 5. – P. 409-415.
232. Washington C. Evaluation of non-sink dialysis methods for the measurement of drug release from colloids: effects of drug partition // *International journal of pharmaceutics*. – 1989. – Vol. 56. – №. 1. – P. 71-74.
233. Zambito Y. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—A case study / Y. Zambito, E. Pedreschi, G. Di Colo // *International journal of pharmaceutics*. – 2012. – Vol. 434. – №. 1-2. – P. 28-34.
234. Кобляков В. А. Механизмы протонирования межклеточного пространства в опухолях // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2015. – №. 3.
235. Harguindey S. Cariporide and other new and powerful NHE1 inhibitors as potentially selective anticancer drugs—an integral molecular/biochemical/metabolic/clinical approach after one hundred years of cancer research / S. Harguindey, J. L. Arranz, J. D. P. Orozco, C. Rauch, S. Fais, R. A. Cardone, S. J. Reshkin // *Journal of translational medicine*. – 2013. – Vol. 11. – №. 1. – P. 282.
236. Stubbs M. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment / M. Stubbs, P. M. McSheehy, J. R. Griffiths, C. L. Bashford // *Molecular medicine today*. – 2000. – Vol. 6. – №. 1. – P. 15-19.
237. Maritim S. Mapping extracellular pH of gliomas in presence of superparamagnetic nanoparticles: towards imaging the distribution of drug-containing nanoparticles and their curative effect on the tumor microenvironment / S. Maritim, D. Coman, Y. Huang, J. U. Rao, J. J. Walsh, F. Hyder // *Contrast media & molecular imaging*. – 2017. – Vol. 2017.
238. Gatenby R. A. Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study / R. A. Gatenby, E. T. Gawlinski, A. F. Gmitro, B. Kaylor, R. J. Gillies // *Cancer research*. – 2006. –

Vol. 66. – №. 10. – P. 5216-5223.

239. Hashim A. I. Imaging pH and metastasis / A. I. Hashim, X. Zhang, J. W. Wojtkowiak, G. V. Martinez, R. J. Gillies // *NMR in biomedicine*. – 2011. – Vol. 24. – №. 6. – P. 582-591.
240. Belhoussine R. Characterization of intracellular pH gradients in human multidrug-resistant tumor cells by means of scanning microspectrofluorometry and dual-emission-ratio probes / R. Belhoussine, H. Morjani, S. Sharonov, D. Ploton, M. Manfait // *International journal of cancer*. – 1999. – Vol. 81. – №. 1. – P. 81-89.
241. Halcrow P. Role of endolysosomes and pH in the pathogenesis and treatment of glioblastoma / P. Halcrow, G. Datta, J. E. Ohm, M. L. Soliman, X. Chen, J. D. Geiger // *Cancer reports*. – 2019. – Vol. 2. – №. 6. – P. e1177.
242. Chittasupho C. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells / C. Chittasupho, S. X. Xie, A. Baoum, T. Yakovleva, T. J. Siahaan, C. J. Berkland // *European journal of pharmaceutical sciences*. – 2009. – Vol. 37. – №. 2. – P. 141-150.
243. Dos Santos T. Effects of transport inhibitors on the cellular uptake of carboxylated polystyrene nanoparticles in different cell lines / T. Dos Santos, J. Varela, I. Lynch, A. Salvati, K. A. Dawson // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6. – №. 9. – P. e24438.
244. Raval J. P. Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres / J. P. Raval, D. R. Naik, K. A. Amin, P. S. Patel // *Journal of Saudi Chemical Society*. – 2014. – Vol. 18. – №. 5. – P. 566-573.
245. Fu Y. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems / Y. Fu, W. J. Kao // *Expert opinion on drug delivery*. – 2010. – Vol. 7. – №. 4. – P. 429-444.
246. Siepmann J. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse / J. Siepmann, N. A. Peppas // *International journal of pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 418. – №. 1. – P. 6-12.
247. Ritger P. L. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices / P. L. Ritger, N. A. Peppas // *Journal of controlled release*. – 1987. – Vol. 5. – №. 1. – P. 37-42.
248. He J. Modeling of drug release from bioerodible polymer matrices / J. He, C. Zhong, J. Mi // *Drug Delivery*. – 2005. – №. 12. – P. 251-259.
249. Hines D. J. Poly (lactic-co-glycolic) acid– controlled-release systems: experimental and modeling insights / D. J. Hines, D. L. Kaplan // *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. – 2013. – Vol. 30. – №. 3.
250. Dash S. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems / S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury // *Acta Pol Pharm*. – 2010. – Vol. 67. – №. 3. –

Vol. 217-223.

251. Costa P. Modeling and comparison of dissolution profiles / P. Costa, J. M. S. Lobo // European journal of pharmaceutical sciences. – 2001. – Vol. 13. – №. 2. – P. 123-133.
252. Alway B. Modelling the dissolution of diazepam in lactose interactive mixtures / B. Alway, R. Sangchantra, P. J. Stewart // International journal of Pharmaceutics. – 1996. – Vol. 130. – №. 2. – P. 213-224.
253. Korsmeyer R. W. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers / R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, N. A. Peppas // International journal of pharmaceutics. – 1983. – Vol. 15. – №. 1. – P. 25-35.
254. Ковшова Т. С. Изучение и математическое описание кинетики высвобождения доксорубина из PLGA наночастиц *in vitro* / Т.С. Ковшова, Н.С. Осипова, А.В. Белов, Е.В. Шипуло, Ю.В. Ермоленко, Ю.А. Малиновская, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина // Биофармацевтический Журнал. — 2020. — Т. 12. — № 4. — С. 32–42.
255. Alhareth K. HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles / K. Alhareth, C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, F. Moussa // Journal of Chromatography B. – 2012. – Vol. 887. – P. 128-132.
256. Druckmann S. Separation of liposome-associated doxorubicin from non-liposome-associated doxorubicin in human plasma: implications for pharmacokinetic studies / S. Druckmann, A. Gabizon, Y. Barenholz // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1989. – Vol. 980. – №. 3. – P. 381-384.
257. Mayer L. D. Determination of free and liposome-associated doxorubicin and vincristine levels in plasma under equilibrium conditions employing ultrafiltration techniques / L. Mayer D., G. S. Onge // Analytical biochemistry. – 1995. – Vol. 232. – №. 2. – P. 149-157.
258. Kim H. S. Simultaneous analysis of liposomal doxorubicin and doxorubicin using capillary electrophoresis and laser induced fluorescence / H. S. Kim, I. W. Wainer // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2010. – Vol. 52. – №. 3. – P. 372-376.
259. Kovshova T. Exploring the interplay between drug release and targeting of lipid-like polymer nanoparticles loaded with doxorubicin / T. Kovshova, N. Osipova, A. Alekseeva, J. Malinovskaya, A. Belov, A. Budko, G. Pavlova, O. Maksimenko, S. Nagpal, S. Braner, H. Modh, V. Balabanyan, M. G. Wacker, S. Gelperina // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – №. – P.
260. Lim H. Temperature-dependent threshold shear stress of red blood cell aggregation / H.J. Lim, Y.J. Lee, J.H. Nam, S. Chung, S. Shin // Journal of biomechanics. – 2010. – Vol. 43. – №. 3. – P. 546-550.

261. Laubrock N. The stability of doxorubicin and Idarubicin in plasma and whole blood / N. Laubrock, G. Hempel, P. Schulze-Westhoff, G. Würthwein, S. Flege, J. Boos // *Chromatographia*. – 2000. – Vol. 52. – №. 1-2. – P. 9-13.
262. Alexis F. Factors affecting the degradation and drug-release mechanism of poly (lactic acid) and poly [(lactic acid)-co-(glycolic acid)] // *Polymer international*. – 2005. – Vol. 54. – №. 1. – P. 36-46.
263. Gu B. Prediction of dexamethasone release from PLGA microspheres prepared with polymer blends using a design of experiment approach / B. Gu, D. J. Burgess // *International journal of pharmaceutics*. – 2015. – Vol. 495. – №. 1. – P. 393-403.
264. Graves R. A. Effect of different ratios of high and low molecular weight PLGA blend on the characteristics of pentamidine microcapsules / R.A. Graves, S. Pamujula, R. Moiseyev, T. Freeman, L.A. Bostanian, T.K. Mandal // *International journal of pharmaceutics*. – 2004. – Vol. 270. – №. 1-2. – P. 251-262.
265. Fredenberg S. The mechanisms of drug release in poly (lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review / S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, A. Axelsson // *International journal of pharmaceutics*. – 2011. – Vol. 415. – №. 1-2. – P. 34-52.
266. Kumskova N. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release / N. Kumskova, Y. Ermolenko, N. Osipova, A. Semyonkin, N. Kildeeva, M. Gorshkova, A. Kovalskii, T. Kovshova, V. Tarasov, J. Kreuter, O. Maksimenko, S. Gelperina // *Journal of Microencapsulation*. – 2020. – Vol. 37. – №. 3. – P. 283-295.
267. Gaspar M. M. Formulation of L-asparaginase-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release / M. M. Gaspar, D. Blanco, M. E. M. Cruz, M. J. Alonso // *Journal of controlled release*. – 1998. – Vol. 52. – №. 1-2. – P. 53-62.
268. Araújo J. Effect of polymer viscosity on physicochemical properties and ocular tolerance of FB-loaded PLGA nanospheres / J. Araújo, E. Vega, C. Lopes, M. A. Egea, M. L. Garcia, E. B. Souto // *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. – 2009. – Vol. 72. – №. 1. – P. 48-56.
269. Körber M. PLGA erosion: solubility-or diffusion-controlled? // *Pharmaceutical research*. – 2010. – Vol. 27. – №. 11. – P. 2414-2420.
270. Grayson A. C. R. Differential degradation rates in vivo and in vitro of biocompatible poly (lactic acid) and poly (glycolic acid) homo-and co-polymers for a polymeric drug-delivery microchip / A.C. Grayson, G. Voskerician, A. Lynn, J.M. Anderson, M.J. Cima, R. Langer // *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2004. – Vol. 15. – №. 10. – P.

1281-1304.

271. Engineer C. Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system / C. Engineer, J. Parikh, A. Raval // Trends in Biomaterials & Artificial Organs. – 2011. – Vol. 25. – №. 2.
272. Allison S. D. Analysis of initial burst in PLGA microparticles //Expert opinion on drug delivery. – 2008. – Vol. 5. – №. 6. – P. 615-628.
273. Toshiro H. Factors influencing the profiles of TRH release from copoly (d, l-lactic/glycolic acid) microspheres / H. Toshiro, O. Hiroaki, O. Yasuaki, T. Hajime //International journal of pharmaceutics. – 1991. – Vol. 72. – №. 3. – P. 199-205.
274. Feng S. Effects of drug and polymer molecular weight on drug release from PLGA-m PEG microspheres / S. Feng, L. Nie, P. Zou, J. Suo // Journal of applied polymer science. – 2015. – Vol. 132. – №. 6.
275. Luan X. Influence of the poly (lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems / X. Luan, R. Bodmeier // Journal of Controlled Release. – 2006. – Vol. 110. – №. 2. – P. 266-272.
276. Walter E. Hydrophilic poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells / E. Walter, D. Dreher, M. Kok, L. Thiele, S. G. Kiama, P. Gehr, H. P. Merkle //Journal of Controlled Release. – 2001. – Vol. 76. – №. 1-2. – P. 149-168.
277. Kataoka K. Doxorubicin-loaded poly (ethylene glycol)–poly ( $\beta$ -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance / K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G.S. Kwon // Journal of Controlled Release. – 2000. – Vol. 64. – №. 1-3. – P. 143-153.
278. Ristroph K. D. Hydrophobic ion pairing: encapsulating small molecules, peptides, and proteins into nanocarriers / K. D. Ristroph, R. K. Prud'homme // Nanoscale Advances. – 2019. – Vol. 1. – №. 11. – P. 4207-4237.
279. Bhattacharjee J. Small angle neutron scattering study of doxorubicin-surfactant complexes encapsulated in block copolymer micelles / J. Bhattacharjee, G. Verma, V. K. Aswal, P. A. Hassan //Pramana. – 2008. – Vol. 71. – №. 5. – P. 991-995.
280. Elizondo E. High loading of gentamicin in bioadhesive PVM/MA nanostructured microparticles using compressed carbon-dioxide / E. Elizondo, S. Sala, E. Imbuluzqueta, D. González, M.J. Blanco-Prieto, C. Gamazo, N. Ventosa, J. Veciana // Pharmaceutical research. – 2011. – Vol. 28. – №. 2. – P. 309-321.
281. Poudel B. K. Development of polymeric irinotecan nanoparticles using a novel lactone preservation strategy / B.K. Poudel, B. Gupta, T. Ramasamy, R.K. Thapa, Y.S. Youn, H.G.

- Choi, C.S. Yong, J.O. Kim//International journal of pharmaceutics. – 2016. – Vol. 512. – №. 1. – P. 75-86.
282. Efiana N. A. Improved intestinal mucus permeation of vancomycin via incorporation into nanocarrier containing papain-palmitate / N. A. Efiana, A. Dizdarević, C. W. Huck, Bernkop- A. Schnürch //Journal of pharmaceutical sciences. – 2019. – T. 108. – №. 10. – C. 3329-3339.
283. Charrois G. J. R. Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer / G. J. R. Charrois, T. M. Allen // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes. – 2004. – Vol. 1663. – №. 1-2. – P. 167-177.
284. Feczko T. Comparison of the preparation of PLGA–BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP / T. Feczko, J. Tóth, J. Gyenis // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2008. – Vol. 319, №. 1-3. – P. 188-195.
285. Shah T. J. Process optimization and characterization of poloxamer solid dispersions of a poorly water-soluble drug / T. J. Shah, A. F. Amin, J. R. Parikh, R. H. Parikh //AAPS PharmSciTech. – 2007. – Vol. 8, №. 2. – P. E18-E24.
286. Wulff-Pérez M. Bulk and interfacial viscoelasticity in concentrated emulsions: The role of the surfactant / M. Wulff-Pérez, A. Torcello-Gómez, A. Martín-Rodríguez, M. Gálvez-Ruiz J., J. De Vicente //Food Hydrocolloids. – 2011. – Vol. 25, №. 4. – P. 677-686.
287. Khalin I. Highly fluorescent biodegradable PLGA nano-carriers allow real-time tracking of individual particles in vivo / I. Khalin, C. Severi, D. Heimburger, A. Wehn, F. Hellal, A. Reisch, A. S. Klymchenko, N. Plesnila //bioRxiv. – 2020.
288. Tercyak A. M. Colorimetric assay for pluronic F-68 as measured in isolated rat liver perfusion systems / A. M. Tercyak, T. E. Felker // Analytical biochemistry. – 1990. – Vol. 187. – №. 1. – P. 54-55.
289. Nuysink J. The effect of polyethylene oxide molecular weight on determination of its concentration in aqueous solutions / J. Nuysink, L. K. Koopal // Talanta. – 1982. – Vol. 29. – №. 6. – P. 495-501.
290. Mao Y. Quantitation of poloxamers in pharmaceutical formulations using size exclusion chromatography and colorimetric methods / Y. Mao, M. J. Thompson, Q. Wang, E. W. Tsai // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2004. – Vol. 35. – №. 5. – P. 1127-1142.
291. Baleux B. Dosage colorimétrique d'agents de surface non ioniques polyoxyéthylènes al'aide d'une solution iodo-iodurée / B. Baleux, G. Champetier // CR Acad. Sc. Paris (C). – 1972. – Vol. 274. – P. 1617-1620.
292. Baker J. A. Investigation of the adsorption configuration of polyethylene oxide and its

- copolymers with polypropylene oxide on model polystyrene latex dispersions / J. A. Baker, J. C. Berg // *Langmuir*. – 1988. – Vol. 4. – №. 4. – P. 1055-1061.
293. Svitova T. Adsorption layer structures and spreading behavior of aqueous non-ionic surfactants on graphite / T. Svitova, R. M. Hill, C. J. Radke // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2001. – Vol. 183. – P. 607-620.
294. Ducker W. A. Effect of substrate hydrophobicity on surfactant surface– aggregate geometry / W. A. Ducker, L. M. Grant // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 100. – №. 28. – P. 11507-11511.
295. Jódar-Reyes A. B. Modeling the effect of structural details of nonionic surfactants on micellization in solution and adsorption onto hydrophobic surfaces / A. B. Jódar-Reyes, J. L. Ortega-Vinuesa, A. Martín-Rodríguez, F. A. M. Leermakers // *Langmuir*. – 2002. – Vol. 18. – №. 22. – P. 8706-8713.
296. Ковшова Т. С. Влияние параметров наносомальной формы доксорубина на основе PLGA на распределение между плазмой и эритроцитами крови человека / Т.С. Ковшова, Н.С. Осипова, А.В. Белов, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2020. – Т. 23. – №. 8. – С. 11–18.
297. Zelepukin I. V. Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth / I.V. Zelepukin, A.V. Yaremenko, V.O. Shipunova, Babenyshev A.V., I.V. Balalaeva, P.I. Nikitin, S.M. Deyev, M.P. Nikitin // *Nanoscale*. – 2019. – Vol. 11. – №. 4. – P. 1636-1646.
298. Terasaki T. Pharmacokinetic study on the mechanism of tissue distribution of doxorubicin: interorgan and interspecies variation of tissue-to-plasma partition coefficients in rats, rabbits, and guinea pigs / T. Terasaki, T. Igax, Y. Sugiyama, M. Hanano // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 1984. – Vol. 73. – №. 10. – P. 1359-1363.
299. Colombo T. Differential adriamycin® distribution to blood components / T. Colombo, M. Broggin, S. Garattini, M. G. Donelli // *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. – 1981. – Vol. 6. – №. 2. – P. 115-122.
300. Piazza E. Adriamycin distribution in plasma and blood cells of cancer patients with altered hematocrit / E. Piazza, M. Broggin, A. Trabattoni, N. Natale, A. Libretti, M. G. Donelli // *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. – 1981. – Vol. 17. – №. 10. – P. 1089-1096.
301. Anselmo A. C. Delivering nanoparticles to lungs while avoiding liver and spleen through adsorption on red blood cells / A. C. Anselmo, V. Gupta, B. J. Zern, D. Pan, M. Zakrewsky, V. Muzykantov, S. Mitragotri // *ACS nano*. – 2013. – Vol. 7, №. 12. – P. 11129-

- 11137.
302. Kalamaridis D. Drug partition in red blood cells / D. Kalamaridis, K. DiLoreto // Optimization in Drug Discovery. – Humana Press, Totowa, NJ, 2014. – P. 39-47.
303. Малиновская Ю. А. Цитотоксичность и гемосовместимость PLGA НЧ, нагруженных доксорубицином / Ю.А. Малиновская, Е.И. Коваленко, Т.С. Ковшова, Н.С. Осипова, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, В.А. Разживина, М.В. Гречихина, А.А. Бойко, С.Э. Гельперина //Российский биотерапевтический журнал. – 2020. – Т. 19. – №. 1. – С. 71-80.
304. FDA U. S. Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. Guidance for Industry //Guidance for Industry. – 2018.
305. Rahman A. Comparative pharmacokinetics of free doxorubicin and doxorubicin entrapped in cardiolipin liposomes / A. Rahman, D. Carmichael, M. Harris, J. K. Roh //Cancer research. – 1986. – Vol. 46. – №. 5. – P. 2295-2299.
306. Le Ray A. M. Fate of [14C] poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles after intravenous and oral administration to mice / A. M. Le Ray, M. Vert, J. C. Gautier, J. Benoit P. //International journal of pharmaceutics. – 1994. – Vol. 106. – №. 3. – P. 201-211.
307. Jain D. Studies on stabilization mechanism and stealth effect of poloxamer 188 onto PLGA nanoparticles / D. Jain, R. Athawale, A. Bajaj, S. Shrikhande, P. N. Goel, R. P. Gude // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2013. – Vol. 109. – P. 59-67.
308. Tröster S. D. Modification of the body distribution of poly (methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants / S. D. Tröster, U. Müller, J. Kreuter // International Journal of Pharmaceutics. – 1990. – Vol. 61, №. 1-2. – P. 85-100.
309. Zhang W. Preparation and evaluation of stealth Tashinone IIA-loaded solid lipid nanoparticles: influence of Poloxamer 188 coating on phagocytic uptake / W. Zhang, J. Liu, S. Li, M. Chen, H. Liu //Journal of microencapsulation. – 2008. – Vol. 25. – №. 3. – P. 203-209.
310. Shubhra Q. T. H. Poloxamers for surface modification of hydrophobic drug carriers and their effects on drug delivery / Q. T. Shubhra, J. Tóth, J. Gyenis, T. Feczko //Polymer Reviews. – 2014. – Vol. 54. – №. 1. – P. 112-138.
311. Storm G. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system / G. Storma, S. O. Belliot, T. Daemen, D. D. Lasic // Advanced drug delivery reviews. – 1995. – Vol. 17. – №. 1. – P. 31-48.
312. Ishihara T. Evasion of the accelerated blood clearance phenomenon by coating of nanoparticles with various hydrophilic polymers / T. Ishihara, T. Maeda, H. Sakamoto, N. Takasaki, M. Shigyo, T. Ishida, H. Kiwada, Y. Mizushima, T. Mizushima //

Biomacromolecules. – 2010. – Vol. 11. – №. 10. – P. 2700-2706.

313. Yuan D. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles / D. Yuan, H. He, Y. Wu, J. Fan, Y. Cao // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2019. – Vol. 108. – №. 1. – P. 58-72.
314. Cui J. X. Direct comparison of two pegylated liposomal doxorubicin formulations: is AUC predictive for toxicity and efficacy? / J. Cui, C. Li, W. Guo, Y. Li, C. Wang, L. Zhang, Zhang, Y. Hao, Y. Wang // *Journal of controlled release*. – 2007. – Vol. 118. – №. 2. – P. 204-215.
315. Zhao Y. A simple way to enhance Doxil® therapy: drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer / Y. Zhao, D. Y. Alakhova, J. O. Kim, T. K. Bronich, A. V. Kabanov // *Journal of Controlled Release*. – 2013. – Vol. 168. – №. 1. – P. 61-69.
316. Choi Y. Doxorubicin-Loaded PLGA Nanoparticles for Cancer Therapy: Molecular Weight Effect of PLGA in Doxorubicin Release for Controlling Immunogenic Cell Death / Y. Choi, H. Y. Yoon, J. Kim, S. Yang, J. Lee, J. W. Choi, Y. Moon, J. Kim, S. Lim, M. K. Shim, S. Jeon, I. C. Kwon, K. Kim // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12. – №. 12. – P. 1165.
317. Castro K. C. Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review / K. C. Castro, J. M. Costa, M. G. N. Campos // *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. – 2020. – P. 1-13.
318. Luque-Michel E. SPION and doxorubicin-loaded polymeric nanocarriers for glioblastoma theranostics / E. Luque-Michel, L. Lemaire, M. J. Blanco-Prieto // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2021. – P. 1-9.

**СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (ТАБЛИЦЫ)**

- Таблица 1 – Типы коллоидных систем, используемых для доставки ЛВ [25; 26] – С. 15.
- Таблица 2 – Условия измерения размеров наночастиц и распределения по размерам – С. 46.
- Таблица 3 – Параметры дисперсионных сред для измерения размеров наночастиц и PDI – С. 47.
- Таблица 4 – Метрологические характеристики методики количественного определения доксорубина методом ВЭЖХ – С. 53.
- Таблица 5 – Программа градиентного режима элюирования – С. 54.
- Таблица 6 – Относительные времена удерживания пиков примесей – С. 54.
- Таблица 7 – Схема приготовления 10-кратных растворов для калибровки в плазме – С. 60.
- Таблица 8 – Схема приготовления 10-кратных суспензий PLGA-Dox НЧ – С. 61.
- Таблица 9 – Параметры математических моделей для анализа кинетических кривых высвобождения доксорубина из PLGA-Dox *in vitro* – С. 65.
- Таблица 10 – Схема приготовления исходных растворов доксорубина для калибровки в плазме – С. 74.
- Таблица 11 – Схема приготовления 10-кратных растворов доксорубина для калибровки в плазме – С. 74.
- Таблица 12 – Диапазоны параметров, заданные для анализа данных с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели (PBNB) – С. 78.
- Таблица 13 – Размеры, PDI и распределение НЧ PLGA-Dox/7,4 по размерам (по объему и интенсивности), определенные методом DLS с использованием NanoBrook Omni; n=3 – С. 84.
- Таблица 14 – Размеры, PDI и распределение НЧ PLGA-Dox/7,4 по размерам (по объему и интенсивности), определенные методом DLS с использованием Zetasizer Nano ZS; n=3 – С. 84.
- Таблица 15 – Влияние разведения на величину  $\zeta$ -потенциала поверхности PLGA-Dox/7,4 НЧ – С. 86.
- Таблица 16 – Размеры, PDI и распределение НЧ PLGA-Dox/7,4 по размерам (по объему и интенсивности), определенные методом DLS с использованием NanoBrook Omni; n=3 – С. 86.
- Таблица 17 – Усредненные физико-химические параметры PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4, определенные методом DLS с использованием Zetasizer Nano ZS; среда – вода Milli-Q; разведение до 0,2 мг/мл по полимеру; n=3 – С. 89.

Таблица 18 – Содержание общего, свободного и включенного в PLGA-Dox/7,4 НЧ, определенные методом ВЭЖХ – С. 90.

Таблица 19 – Содержание примесей в субстанции доксорубина в 0,1 % ТФК с концентрацией 516 мкг/мл (pH  $\approx$  2) – С. 92.

Таблица 20 – Содержание примесей в образце PLGA-Dox/7,4 (репрезентативные данные) – С. 93.

Таблица 21 – Степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом ультрафильтрации (n=6) [201] – С. 97.

Таблица 22 – Степень включения доксорубина (%) в PLGA-Dox при отделении НЧ методом гель-фильтрации, (n=6) [201] – С. 98.

Таблица 23 – Содержание ПВС во флаконе PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4; репрезентативные данные, среднее значение  $\pm$  SD (n=10) – С. 100.

Таблица 24 – Физико-химические параметры плацебо-PLGA и PLGA-Dox НЧ при хранении (0-6 месяцев; температура –  $+5\pm 2$  °C); средние значения  $\pm$  SD; n = 3 – С. 102.

Таблица 25 – Физико-химические характеристики неотмытых и отмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ (n=3) – С. 105.

Таблица 26 – Степень включения и нагрузка доксорубина в неотмытых и отмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ (n=3) – С. 105.

Таблица 27 – Математическое описание профилей высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в 1 % растворе полоксамера 188, n=3 [254] – С. 117.

Таблица 28 – Математическое описание и сравнение профилей (1-48 ч) высвобождения доксорубина из неотмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ и отмытых – PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/7,4(G-25); \* - репрезентативные данные – С. 118.

Таблица 29 – Влияние экстрагента на степень извлечения общего доксорубина из плазмы; значения приведены для PLGA-Dox/7,4 НЧ; доверительный интервал для n=3, P=0,95 – С. 121.

Таблица 30 – Влияние экстрагента на содержание (%) свободного доксорубина в плазме; значения приведены для PLGA-Dox/7,4 НЧ; доверительный интервал для n=3, P=0,95 – С. 123.

Таблица 31 – Физико-химические параметры наночастиц с разным профилем высвобождения доксорубина (средние значения  $\pm$  sd); n=3 – С. 127.

Таблица 32 – Влияние доксорубина на температуру стеклования Resomer®502H – С. 128.

Таблица 33 – Сравнение параметров образцов полимера PLGA, указанных производителями и

измеренных экспериментально. Адаптировано из [266] – С. 130.

Таблица 34 – Физико-химические параметры PLGA-Dox НЧ, полученных на основе двух видов PLGA 50:50; репрезентативные данные (\*). Адаптировано из [266] – С. 130.

Таблица 35 – Значения удельной сорбции полксамера 188 на поверхности PLGA-Dox/7,4 и плацебо-PLGA НЧ относительно массы полимера (мг/мг) и площади поверхности НЧ (мг/м<sup>2</sup>); средние значения ± SD (n=3) – С. 141.

Таблица 36 – Значение коэффициентов распределения доксорубицина между плазмой и эритроцитами крови в зависимости от общей концентрации доксорубицина и времени инкубации в цельной крови человека; средние значения ± SD, n=3. Адаптировано из [296] – С. 145.

Таблица 37 – Концентрации общего доксорубицина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/7,4 в 1 % растворе полксамера 188 – С. 150.

Таблица 38 – Концентрации свободного доксорубицина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/7,4 в 1 % растворе полксамера 188 – С. 150.

Таблица 39 – Концентрации общего доксорубицина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/6,4 в 1 % растворе полксамера 188 – С. 151.

Таблица 40 – Концентрации свободного доксорубицина в плазме крови крыс после введения суспензии PLGA-Dox/6,4 в 1 % растворе полксамера 188 – С. 151.

Таблица 41 – Концентрации доксорубицина в плазме крови крыс после введения раствора субстанции доксорубицина гидрохлорида в воде (2 мг/мл) – С. 152.

Таблица 42 – Фармакокинетические параметры общего и свободного доксорубицина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм в дозе 5 мг/кг в сравнении с субстанцией доксорубицина, рассчитанные внемодельным методом. Адаптировано из [259] – С. 153.

Таблица 43 – Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубицина, рассчитанные с использованием PBNB модели. Адаптировано из [259] – С. 158.

Таблица 44 – Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубицина, рассчитанные с использованием PBNB при ограничении диапазона значений времени полувыведения носителя. Адаптировано из [259] – С. 159.

**СПИСОК ИЛЛЮСТРАЦИЙ (РИСУНКИ)**

Рисунок 1 – Химическая структура доксорубина – С. 12.

Рисунок 2 – Химическая структура некоторых полимеров, применяемых для получения наночастиц: (А) полилактиды – PLA; (Б) сополимеры молочной и гликолевой кислот – PLGA; (В) хитозан; (Г) альгинат натрия – С. 17.

Рисунок 3 – Динамика роста числа публикаций (в год) по запросу «PLGA nanoparticles» в базе данных PubMed (1995-2020) – С. 18.

Рисунок 4 – Способы гидрофилизации поверхности наночастиц. А – полиэтиленгликоль (ПЭГ); Б – взаимодействие блоксополимеров полиэтиленоксида (PEO) и полипропиленоксида (PPO) с поверхностью наночастиц; В – поллоксамеры; Г – поллоксамины – С. 21.

Рисунок 5 – Эффект повышенной проницаемости и удерживания наночастиц и макромолекул в опухоли (эффект EPR) – С. 22.

Рисунок 6 – Структура ГЭБ. Особенности строения капилляров мозга – С. 30.

Рисунок 7 – Рецептор-опосредованный трансцитоз в ГЭБ. Лиганд связывается с его специфическим рецептором на апикальной мембране эндотелиальной клетки мозга (1), и инициирует инвагинацию плазматической мембраны и процесс эндоцитоза (2). Внутри клетки везикула может следовать различным маршрутам движения, включая рециркуляцию (возвращение) рецептора на апикальную мембрану (3) или слияние везикулы с базолатеральной мембраной с последующим высвобождением содержимого пузырька [трансцитоз, (4)]. Кроме того, везикула может направляться к лизосоме (5), где ее содержимое будет подвержено деградации. Адаптировано из *Pulgar V. M. Transcytosis to cross the blood brain barrier, new advancements and challenges //Frontiers in neuroscience. 2019; 12:1019 [124] Copyright © (2019) Pulgar (CC BY 4.0 open access)* – С. 34.

Рисунок 8 – Иллюстрация модели PBNB, используемой для анализа фармакокинетических данных. Модель состоит из трех основных отсеков, включая связанную с носителем (серый цвет) и высвобожденную фракцию лекарственного вещества (зеленый цвет), а также один периферический отсек (синий цвет), куда происходит распределение свободной фракции лекарственного вещества – С. 78.

Рисунок 9 – Получение PLGA-Dox НЧ методом «двойных эмульсий» – С. 81.

Рисунок 10 – Влияние параметров измерения на средний размер (Zaved) и индекс полидисперсности PLGA-Dox/7,4 НЧ – С. 85.

Рисунок 11 – Влияние типа и концентрации криопротектора на размер, PDI и содержание микроагрегатов в суспензии PLGA-Dox/6,4 НЧ – С. 88.

Рисунок 12 – Распределение по размерам образца PLGA-Dox/6,4 после лиофилизации с использованием маннита в качестве криопротектора (10 % масс.) – С. 88.

Рисунок 13 – Электронная микрофотография PLGA-Dox/7,4 наночастиц (просвечивающий электронный микроскоп JEOL JEM-1400, Япония); контрастирующий агент 1 % раствор уранила ацетата [201] – С. 89.

Рисунок 14 – Хроматограмма испытуемого раствора образца PLGA-Dox/7,4 (свободный доксорубицин) – С. 91.

Рисунок 15 – Хроматограмма испытуемого раствора субстанции доксорубицина в 0,1 % ТФК с концентрацией 516 мкг/мл ( $\text{pH} \approx 2$ ) – С. 92.

Рисунок 16 – Ионизация молекулы доксорубицина в водных растворах – С. 94.

Рисунок 17 – Влияние режима центрифугирования на степень включения доксорубицина (%) в PLGA-Dox/7,4\* и PLGA-Dox/6,4\* наночастицы и эффективность осаждения наночастиц по содержанию PLGA (%) в супернатанте ( $n = 6$ , среднее  $\pm$  SD); # –  $p < 0,05$  [201] – С. 95.

Рисунок 18 – Калибровочные растворы для определения ПВС: справа налево концентрация ПВС увеличивается, оранжевая окраска раствора  $\text{I}_2$  в KI сменяется зеленой в результате образования комплекса синего цвета ПВС с  $\text{I}_2$  в KI в присутствии борной кислоты с длиной волны поглощения 673 нм – С. 99.

Рисунок 19 – Термограмма образцов PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ – С. 101.

Рисунок 20 – Размер PLGA-Dox/7,4 НЧ при инкубации в воде, фосфатном буфере (PBS,  $\text{pH}=7,4$ ) или 0,9 % растворе хлорида натрия;  $+37^\circ\text{C}$  – С. 106.

Рисунок 21 – Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 НЧ в 0,1 М HEPES буфере с  $\text{pH}=7,4$  (голубой), 1 % растворе полоксамера 188 (синий) и 1 % растворе полисорбата 80 (фиолетовый); температура инкубации  $+37^\circ\text{C}$ ; разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугирование при ускорении  $48254 \times g$ ;  $n=3$  – С. 107.

Рисунок 22 – Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/6,4 НЧ в 0,1 М HEPES буфере с  $\text{pH}=7,4$  (голубой), 1 % растворе полоксамера 188 (синий) и 1 % растворе полисорбата 80 (фиолетовый); температура инкубации  $+37^\circ\text{C}$ ; разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугирование при ускорении  $48254 \times g$ ;  $n=3$  – С. 108.

Рисунок 23 – Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 НЧ в 1 % растворе полоксамера 188 при разных температурах инкубации:  $+25$  (пунктирная линия) и  $+37^\circ\text{C}$

(сплошная линия); разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугирование при ускорении  $15000 \times g$ ;  $n=3$  – С. 109.

Рисунок 24 – Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) НЧ в 1 % растворе P188; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С. Влияние режима центрифугирования:  $15000 \times g$ , +18 °С (пунктирная линия) и  $48254 \times g$ , +5 °С (сплошная линия);  $n=3$  – С. 110.

Рисунок 25 – Высвобождение доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) НЧ в 1 % растворе полоксамера 188, температура инкубации +37 °С. Влияние степени разведения: 1:5 (пунктирная линия) и 1:25 (сплошная линия). Отделение наночастиц методом центрифугирования ( $48254 \times g$ , +5 °С);  $n=3$  – С. 111.

Рисунок 26 – Профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в воде при отделении НЧ методом диализа (пунктирная линия) и в 1 % полоксамере 188 при отделении НЧ центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$ ; температура инкубации +37 °С; разведение 1:25 ( $n=3$ ) – С. 112.

Рисунок 27 – Профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в воде при отделении НЧ методом диализа и из отмытых PLGA-Dox/7,4(G-25) и PLGA-Dox/7,4(G-25) в 1 % полоксамере 188 при отделении НЧ центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$ ; температура инкубации +37 °С; разведение 1:25 ( $n=3$ ) – С. 113.

Рисунок 28 – Профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в натрий-ацетатном буфере (0,1 моль/л, pH=4,5), MES буфере (0,1 моль/л, pH=6,5) и 1 % растворе полоксамера 188; температура инкубации +37 °С; разведение 1:25; метод отделения НЧ – центрифугированием с ускорением  $48254 \times g$ ;  $n=3$  – С. 115.

Рисунок 29 – Типичная хроматограмма испытуемого раствора при определении общего доксорубицина в плазме в концентрации 50 мкг/мл; время удерживания доксорубицина – 3,263 мин, даунорубицина (BC) – 4,940 мин – С. 120.

Рисунок 30 – Влияние режима центрифугирования на содержание свободного доксорубицина в плазме крови для PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4; сравнение режимов центрифугирования ( $15000 \times g$  /  $48254 \times g$ ); экстракция смесью АЦН:ДМСО (1:1) с добавлением 0,1 % МК;  $n = 3$  – С. 122.

Рисунок 31 – Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в плазме (контроль – субстанция доксорубицина);  $n=3$ . Адаптировано из [259] – С. 124.

Рисунок 32 – Профиль высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 Н (MW 10,3 кДа) и PLGA с низкой

молекулярной массой Lactel® B6013-1G (MW 4,7 кДа); разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С); репрезентативные серии; n=3. Адаптировано из [266] – С. 131.

Рисунок 33 – Профиль гидролитической деградации PLGA-Dox НЧ на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 Н (MW 10,3 кДа) и PLGA с низкой молекулярной массой Lactel® B6013-1G (MW 4,7 кДа); среда – PBS (pH=7,4). Адаптировано из [266] – С. 132.

Рисунок 34 – Влияние содержания PLGA с концевыми кислотными группами в композиции на степень включения доксорубина в НЧ – С. 134.

Рисунок 35 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 Н, PLGA с концевыми сложноэфирными группами Resomer® 502 S, а также их смеси 1:1; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С); n=3 – С. 135.

Рисунок 36 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA с высокой вязкостью (0,66 дл/г) с добавлением низкомолекулярного олигомера ( $\approx 700$ -800 Да), и НЧ на основе Resomer® 502 Н, содержащих комплекс доксорубин-АОТ; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С); n=3 – С. 137.

Рисунок 37 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе Resomer® 502 Н, содержащих комплекс доксорубин-АОТ (PLGA-Dox/АОТ), в натрий-ацетатном буфере (0,1 М, pH=4,5) и 1 % растворе полоксамера 188; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ( $48254 \times g$ , +5 °С); n=3 – С. 138.

Рисунок 38 – Структура полоксамера 188 – С. 139.

Рисунок 39 – Схематическое изображение анализа распределения общего доксорубина между плазмой и эритроцитами крови – С. 143.

Рисунок 40 – Гемолиз эритроцитов (%) при инкубации с PLGA-Dox/7,4 НЧ в диапазоне концентраций  $\approx 0,2$ -200 мкг/мл по доксорубину по сравнению с (-) контролем (инкубация в фосфатно-солевом буфере) в течение 2 ч, +37 °С; n=5, \* –  $p < 0,05$  (по отношению к (-) контролю) – С. 144.

Рисунок 41 – Значения коэффициентов распределения доксорубина между плазмой и эритроцитами после инкубации доксорубина (контроль) и наносомальных форм доксорубина в концентрации 50 мкг/мл в крови, средние значения  $\pm SD$ , n=3. Адаптировано из [296] – С. 146.

Рисунок 42 – Хроматограмма пробы плазмы крови через 30 мин после введения PLGA-Dox/7,4 НЧ в дозе 5 мг/кг; время удерживания доксорубицина – 3,582 мин, время удерживания даунорубицина (внутренний стандарт) – 6,953 мин; объем вкола – 10 мкл – С. 149.

Рисунок 43 – Усредненные фармакокинетические профили (0-1 час) свободного (Free, пунктирная линия) и общего (Total, сплошная линия) доксорубицина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/7,4 (оранжевый) в 1 % растворе полоксамера 188, а также раствора гидрохлорида доксорубицина в воде (контроль) в дозе 5 мг/кг. Адаптировано из [259] – С. 155.

Рисунок 44 – Усредненные фармакокинетические профили (0-48 час) свободного (Free, пунктирная линия) и общего (Total, сплошная линия) доксорубицина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/7,4 (оранжевый) в 1 % растворе полоксамера 188, а также раствора гидрохлорида доксорубицина в воде (контроль) в дозе 5 мг/кг – С. 156.

Рисунок 45 – Моделирование высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) *in vivo* с использованием модели PBNB Адаптировано из [259] – С. 158.

## Благодарность

Автор выражает глубокую признательность и благодарность своему научному руководителю Балабаньяну Вадиму Юрьевичу, д. фарм.н, ведущему научному сотруднику лаборатории генных и клеточных технологий ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова за общее руководство над диссертацией, всестороннюю помощь и поддержку в выполнении исследований.

Автор выражает особую благодарность всему коллективу инжинирингового центра РХТУ имени Д.И. Менделеева и особую благодарность Гельпериной Светлане Эммануиловне, д.х.н., профессору кафедры химии и технологии биомедицинских препаратов РХТУ имени Д.И. Менделеева, за неоценимую помощь в исследованиях и обсуждении экспериментальных данных, переданные знания, многочисленные советы и консультации, а также к. х. н. О. О. Максименко, к. х. н. Е. В. Шипуло, к. х. н. Ю. В. Ермоленко, Н. С. Осиповой, к.х.н. А. В. Белову за помощь в выполнении исследований и сотрудничество.

Исследование фармакокинетики наносомальных форм доксорубицина выполнено в НИИ Морфологии человека. Автор выражает особую благодарность к. б. н. А. С. Халанскому, а также А. И. Алексеевой за полученные знания и опыт, помощь в проведении экспериментов с участием лабораторных животных.

Автор выражает благодарность А. П. Будько, научному сотруднику лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина Минздрава России за помощь в проведении фармакокинетического исследования наносомальных форм доксорубицина.