

УДК 544.77

МНОГОСЛОЙНЫЕ ПОЛИМЕРНЫЕ КАПСУЛЫ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

© 2024 г. Д. В. Калениченко^{a, b, *}, Г. О. Нифонтова^b, И. С. Крюкова^a, А. Суханова^b, И. Набиев^{a, b}

^a Национальный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

^b Университет Реймса Шампань-Арденны, Реймс, 51100 Франция

*E-mail: dasha09941kalenichenko@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Разработка систем контролируемой адресной доставки препаратов для персонализированной терапии рака является одной из важнейших задач современной медицины. Контролируемая доставка и высвобождение противоопухолевых препаратов обеспечивают снижение их токсичности для нормальных клеток организма человека и уменьшают побочные эффекты терапии рака. Многослойные полимерные капсулы (МПК) являются перспективными потенциальными кандидатами для разработки систем доставки на их основе. МПК получают с помощью послойной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности заряженного микросубстрата сферической формы. Данный метод позволяет получать МПК различной структуры, функционализировать их противоопухолевыми агентами и направляющими биомолекулами для их адресной доставки к опухоли. В представленной работе описаны основные этапы получения МПК, а также проанализированы факторы, влияющие на эффективность загрузки в МПК противоопухолевого препарата доксорубин с помощью метода пассивной диффузии.

Ключевые слова: многослойные полимерные капсулы, противоопухолевые препараты, доксорубин, пассивная диффузия

DOI: 10.56304/S207956292405021X

ВВЕДЕНИЕ

Конструирование систем для адресной терапии рака является важным направлением развития противоопухолевой терапии в онкологической практике. Показано, что МПК могут служить перспективными микроносителями для адресной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных препаратов. Кроме того, возможность функционализации МПК контрастными или флуоресцентными зондами, а также специфичными к онкомаркерам биомолекулами, делает МПК эффективными тераностическими агентами с большим клиническим потенциалом [1]. В настоящее время использование таких микроносителей является одним из перспективных направлений исследований в области трансляционной медицины, персонализированной диагностики и направленной терапии различных заболеваний человека [2].

Доксорубин (ДОКС) является одним из широко распространенных противоопухолевых препаратов, применяемых в качестве первой линии лечения различных видов рака. Использование

этого препарата имеет определенные ограничения, связанные с широким спектром нежелательных побочных эффектов терапии и его прямой токсичности. Таким образом, инкапсулирование ДОКС в биосовместимые микроносители с возможностью его контролируемого высвобождения может позволить снизить его токсические эффекты на организм пациента. С точки зрения конструирования подобных микроносителей, важным свойством ДОКС являются его флуоресцентные свойства, позволяющие исследовать и количественно определять эффективность его загрузки в подготовленные субстраты, а также, в дальнейшем, анализировать его биораспределение в тканях или клетках с использованием флуоресцентной визуализации препарата [3, 4].

В настоящей работе разработан способ включения ДОКС в МПК с помощью метода пассивной диффузии, проанализирована возможность включения ДОКС в МПК с полый структурой, а также определены оптимальные значения pH и ионной силы среды, используемых для загрузки лекарства в средство его доставки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На первом этапе работы были синтезированы и охарактеризованы микрочастицы карбоната кальция со слабым отрицательным зарядом поверхности, как было описано ранее [4–6]. ПМК были получены методом послойной адсорбции противоположно заряженных полимеров (ПАП) с использованием полиэлектролитов поли(аллиламина гидрохлорида) (ПАГ) и поли(натрий 4-стиролсульфоната) (ПСС). После приготовления микрочастиц, имеющих структуру “ядро-полимерная оболочка”, ядро из карбоната кальция удаляли с помощью 0.5 М раствора ЭДТА, pH 8.0 [4, 6]. Приготовленные микрочастицы с адсорбированными на их поверхности восемью последовательными слоями ПАГ и ПСС, а также полые МКП на их основе были охарактеризованы методом динамического рассеяния света и лазерного доплеровского микроэлектрофореза с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical).

ДОКС был инкапсулирован в ПМК методом пассивной диффузии. Для этого готовили суспензии ПМК в 0.5 мл 0.05 М фосфатных буферных растворах с различными значениями pH и различной концентрацией NaCl. Полученные суспензии инкубировали при 25°C в течение 16 ч при постоянном перемешивании. После инкубации суспензии центрифугировали при $8609 \times g$ в течение 5 мин, супернатант удаляли, а полученные микроносители ресуспендировали в 0.5 мл ультрачистой воды. Эффективность инкапсуляции (ЭИ) и коэффициент загрузки (КЗ) рассчитывали, как было описано ранее [4, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе были получены сферические микрочастицы карбоната кальция со средним диаметром 2.48 ± 0.53 мкм и ζ -потенциалом -25.1 ± 0.3 мВ. Высокая степень дисперсности и отрицательный поверхностный заряд синтезированных микрочастиц позволили использовать их в качестве субстрата для эффективной последовательной адсорбции полиэлектролитов. После удаления ядер из гибридных микрочастиц, были получены образцы гомогенных полых МПК размером около 2 мкм.

ДОКС-содержащие МПК были приготовлены методом пассивной диффузии. Загрузка ДОКС в предварительно полученные полые МПК может происходить за счет изменения проницаемости оболочки МПК двумя возможными способами: либо путем адсорбции, обусловленной электростатическим взаимодействием противоположно заряженных компонентов системы (в данном случае ДОКС с положительным зарядом $+21.3 \pm 2.2$ мВ и ПСС с отрицательным зарядом -20.4 ± 2.2 мВ);

либо путем диффузии ДОКС внутрь оболочки полимерной капсулы при изменении pH и содержания NaCl в микроокружении ПМК [4] (рис. 1а). При этом, основным преимуществом электростатически связанных комплексов является их высокая чувствительность к pH и ионной силе среды [8, 9]. При изменении pH в ПАГ/ПСС стенках МПК могут образовываться поры, через которые ДОКС из раствора проникает в полость МПК. При увеличении концентрации NaCl в реакционной смеси, возможно, аналогичное набухание за счет эффекта экранирования зарядов в многослойных полимерных структурах [10] (рис. 1б).

Для определения оптимальных условий загрузки ДОКС в полые полимерные микроносители использовали образцы 0.05 М фосфатного буферного раствора, характеризующихся значениями pH 6.0, 7.0 или 8.0, а также содержащих NaCl в концентрационном диапазоне 0.5–2 М. Количество загружаемого ДОКС при этом составляло 0.016 мг во всех исследованных образцах. Полученные значения ЭИ и КЗ с помощью пассивной диффузии представлены в табл. 1.

Полученные результаты показывают, что максимальные значения ЭИ ДОКС были достигнуты при использовании 0.05 М фосфатного буфера (pH 8.0), содержащего 0.05 М NaCl, что и является оптимальными условиями для загрузки ДОКС в МПК методом пассивной диффузии.

Ранее нами были получены результаты инкапсуляции ДОКС в гибридные микроносители структуры “ядро-полимерная оболочка” методом ко-преципитации [7], в которых была проанализирована степень загрузки ДОКС при использовании различных концентраций ДОКС в реакционной смеси. Для проведения сравнительного анализа эффективности двух методов загрузки нами была проведена загрузка ДОКС в МПК методом пассивной диффузии в выбранных оптимальных условиях инкапсуляции (в 0.05 М фосфатном буфере (pH 8.0), содержащем 0.05 М NaCl), варьируя количество ДОКС.

Полученные результаты (табл. 2) показывают, что наиболее высокая эффективность инкапсуляции ДОКС методом пассивной диффузии достигается при содержании 0.016 мг ДОКС в реакционной смеси, причем при дальнейшем увеличении количества ДОКС в реакционной смеси эта эффективность существенно не меняется.

Таким образом, полученные результаты показали, что эффективность загрузки ДОКС в полые микроструктуры методом пассивной диффузии сходна с эффективностью загрузки препарата в микроносители структуры “ядро-полимерная оболочка” методом ко-преципитации. Следует

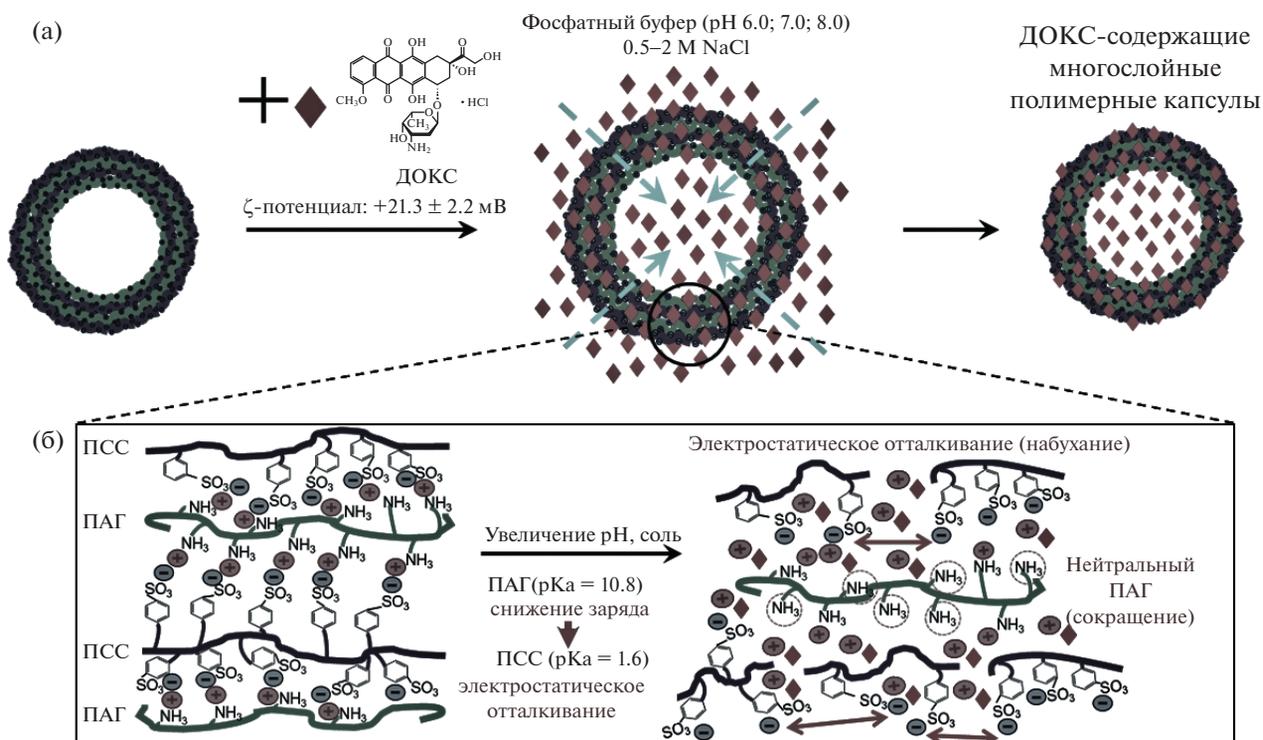


Рис. 1. Схема получения доксорубин-содержащих многослойных полимерных капсул (а) и иллюстрация образования пор в стенках многослойных капсул при изменении условий их микроокружения (б). ДОКС – доксорубин; ПАГ – поли(аллиламин гидрохлорид); ПСС – поли(натрий 4-стиролсульфонат).

заметить, что загрузка функциональных противоопухолевых агентов методом пассивной диффузии является наиболее универсальной, так как позволяет загружать в полые микроносители как

низкомолекулярные лекарственные вещества, так и иммунотерапевтические препараты белковой природы в зависимости от размеров пор, образующихся в полимерной оболочке при загрузке. Разра-

Таблица 1. Эффективность инкапсуляции доксорубина в многослойные полимерные капсулы методом пассивной диффузии в зависимости от свойств среды *

	Условия проведения инкапсуляции	Коэффициент загрузки, %	Эффективность инкапсуляции, %
1	ФБ**(pH 6.0), 0.5 М NaCl	$5.68 \cdot 10^{-8} \pm 2.22 \cdot 10^{-10}$	10.9 ± 0.04
2	ФБ (pH 6.0), 1 М NaCl	$5.66 \cdot 10^{-8} \pm 1.43 \cdot 10^{-8}$	10.9 ± 2.8
3	ФБ (pH 6.0), 2 М NaCl	$8.17 \cdot 10^{-8} \pm 7.42 \cdot 10^{-9}$	15.7 ± 1.4
4	ФБ (pH 7.0), 0.5 М NaCl	$5.59 \cdot 10^{-9} \pm 1.7 \cdot 10^{-10}$	44.9 ± 1.4
5	ФБ (pH 7.0), 1 М NaCl	$5.37 \cdot 10^{-9} \pm 1.01 \cdot 10^{-9}$	43.1 ± 8.1
6	ФБ (pH 7.0), 2 М NaCl	$7.52 \cdot 10^{-8} \pm 2.69 \cdot 10^{-8}$	14.4 ± 5.2
7	ФБ (pH 8.0), 0.5 М NaCl	$2.7 \cdot 10^{-9} \pm 1.49 \cdot 10^{-9}$	52.1 ± 2.9
8	ФБ (pH 8.0), 1 М NaCl	$2.56 \cdot 10^{-9} \pm 1.17 \cdot 10^{-13}$	49.2 ± 0.002
9	ФБ (pH 8.0), 2 М NaCl	$1.23 \cdot 10^{-7} \pm 5.26 \cdot 10^{-9}$	23.6 ± 1.01

* Представлены усредненные данные по трем повторам; **ФБ – Фосфатный Буфер.

Таблица 2. Эффективность инкапсуляции доксорубина в многослойные полимерные капсулы методом пассивной диффузии в зависимости от количества препарата

	Количество загружаемого ДОКС, мг	Коэффициент загрузки, %	Эффективность инкапсуляции, %
1	0.0003	$2.78 \cdot 10^{-9} \pm 4.54 \cdot 10^{-9}$	38.7 ± 4.7
2	0.003	$2.29 \cdot 10^{-8} \pm 6.05 \cdot 10^{-9}$	54.2 ± 1.6
3	0.004	$4.02 \cdot 10^{-8} \pm 1.14 \cdot 10^{-11}$	57.4 ± 0.33
4	0.008	$1.1 \cdot 10^{-7} \pm 9.1 \cdot 10^{-9}$	70.45 ± 1.38
5	0.016	$1.5 \cdot 10^{-7} \pm 2.88 \cdot 10^{-8}$	78.18 ± 1.43
6	0.33	$1.48 \cdot 10^{-7} \pm 6.92 \cdot 10^{-9}$	77.95 ± 2.3

* Представлены усредненные данные по трем повторам.

ботанный универсальный подход может быть использован при конструировании микроносителей для эффективной инкапсуляции противоопухолевых соединений с целью их направленной доставки в опухоль и последующего пролонгированного высвобождения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты продемонстрировали возможность эффективной загрузки противоопухолевого лекарства ДОКС в полые полимерные микроносители с помощью метода пассивной диффузии. Были найдены оптимальные условия загрузки микроносителей лекарством в зависимости от значения pH, ионной силы среды, а также от количественного содержания ДОКС в реакционной смеси. Полученные МПК, содержащие ДОКС, могут быть дополнительно функционализированы распознающими онкомаркерами биомолекулами для адресной доставки лекарств и использования в качестве тераностических агентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящее исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 22-75-10103.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Nifontova G., Ramos-Gomes F., Baryshnikova M., et al. // Front. Chem. 2019. V. 7. P. 2019.00034.
2. Timin A.S., Gao H., Voronin D.V., et al. // Adv. Mater. Interfaces. 2017. V. 4. P. 1600338.
3. Fraczkowska K., Bacia M., Przybyło M., et al. // Biomed. Pharmacother. 2018. V. 97. P. 1195.
4. Kalenichenko D., Nifontova G., Karaulov A., et al. // Nanomaterials. 2021. V. 11. P. 3055.
5. Nifontova G., Krivenkov V., Zvaigzne M., et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2020. V. 12. P. 35882.
6. Nifontova G., Kalenichenko D., Baryshnikova M., et al. // Photonics. 2019. V. 6. P. 117.
7. Kalenichenko D., Nifontova G., Sukhanova A., Nabiev I. // J. Phys.: Conf. Ser. 2021. V. 2058. P. 012009.
8. Pechenkin M.A., Möhwald H., Volodkin D.V. // Soft Matter. 2012. V. 8. P. 8659.
9. Chen J., Xu S., Tang C.Y., et al. // Desalination. 2023. V. 555. P. 116520.
10. Lulevich V.V., Vinogradova O.I. // Langmuir. 2004. V. 20. P. 2874.

Multilayered Polymer Capsules for Targeted Delivery of Antitumor Compounds

D. V. Kalenichenko^{1, 2, *}, G. O. Nifontova², I. S. Kriukova¹, A. Sukhanova², and I. Nabiev^{1, 2}

¹Laboratory of Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

²Laboratoire de Recherche en Nanosciences, LRN-EA4682, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 51100 France

*e-mail: dasha09941kalenichenko@gmail.com

Received May 30, 2023; revised June 6, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—The development of controlled targeted drug delivery systems for personalized cancer therapy is one of the most important tasks of modern medicine. Controlled delivery and releasing of antitumor drugs provide a reduction in their toxicity to normal human cells and reduce the severity of side effects of cancer therapy. Multilayer polymeric capsules (MPCs) are promising potential candidates for the development of

delivery systems based on them. MPCs are produced by layer-by-layer adsorption of oppositely charged polyelectrolytes on the surface of a charged microsubstrate of spherical shape. This method allows to obtain MPCs of different structures and functionalize them with antitumor agents and biomolecules for cancer targeted delivery. The paper presents the main stages of the production of MPCs and analyzes the efficiency of loading the anticancer drug doxorubicin (DOX) within the MPCs using passive diffusion.

Keywords: multilayer polymeric capsules, antitumor drugs, doxorubicin, passive diffusion