

УДК 544.77.03

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ ПЛГА, СОДЕРЖАЩИХ ВОРИНОСТАТ, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

© 2024 г. И. А. Гуляев^а, *, М. Б. Сокол^а, М. А. Клименко^а, М. Р. Моллаева^а,
Н. Г. Яббаров^а, М. В. Чиркина^а, Е. Д. Никольская^а, **

^аИнститут биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: refuzors@yandex.ru

**E-mail: elenanikolskaja@gmail.com

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 10.06.2023 г.

Принята к публикации 12.06.2023 г.

Данная работа посвящена разработке метода получения наночастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, содержащих противоопухолевый препарат – вориностат. Технология получения полимерных частиц была оптимизирована с помощью планов Бокса–Бенкена. Синтезированные по оптимизированной технологии наночастицы обладали сферической формой, подтвержденной с помощью просвечивающей электронной микроскопии, средним диаметром 196 нм, индексом полидисперсности 0.089 и дзета-потенциалом –22.3 мВ. Общее содержание вориностата в наночастицах составило 0.91 мас. %, анализ проводили с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: вориностат, сополимер молочной и гликолевой кислот, ПЛГА, полимерные частицы, рак молочной железы, планы Бокса–Бенкена

DOI: 10.56304/S2079562924050191

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы (РМЖ) у женщин встречается наиболее часто среди всех видов злокачественных опухолей [1]. Лечение РМЖ осложняется тем, что после проведения стандартной неoadъювантной терапии существует высокая вероятность развития химиорезистентности [2]. Создание новых систем доставки лекарственных препаратов, а также применение комбинированной терапии является перспективным подходом для преодоления химиорезистентности и увеличения эффективности терапии.

Наночастицы за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффект – Enhanced permeability and retention effect) могут избирательно доставлять лекарственные препараты в опухолевые ткани, обладая при этом контролируемой скоростью высвобождения лекарств, поддерживая концентрацию действующего вещества на необходимом терапевтическом уровне [3, 4].

Полимерные наночастицы являются перспективными системами доставки для повышения эффективности противоопухолевых препаратов, а также для снижения неспецифической токсичности, что способствует уменьшению побочных

эффектов и улучшению качества жизни пациентов [5]. Наиболее распространенным полимером при создании наночастиц является сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА). Использование данного сополимера обусловлено его широким применением в клинической практике, поскольку он является биodeградируемым и биосовместимым полимером. Наночастицы из ПЛГА, содержащие различные препараты, показали большой потенциал их применения для терапии ряда заболеваний [6–10].

Разработка технологии синтеза наночастиц – нетривиальная задача, требующая системного подхода под индивидуальное соединение, которое необходимо включить в частицы. Одним из наиболее распространенных подходов оптимизации методов, с возможностью варьирования нескольких параметров, являются планы Бокса–Бенкена. Использование планов Бокса–Бенкена позволяет сократить количество экспериментов до минимально необходимого и провести численную оптимизацию, а также прогнозирование заданных параметров. Ранее этот подход уже был успешно использован при разработке метода получения полимерных наночастиц [11–13].

Воринонат (SANA) – ингибитор гистондеацетилазы, эффективный противоопухолевый препарат, одобренный для терапии Т-клеточной лимфомы. Воринонат способен ингибировать ферменты – гистондеацетилазы I и II классов. Механизм действия SANA связан с взаимодействием с атомом цинка в активном сайте белка, в результате чего блокируется каталитическая активность фермента и происходит накопление ацетилированных белков, включая гистоны, что приводит к остановке клеточного цикла, индукции апоптоза, ингибировании ангиогенеза, подавлении действия иммуносупрессивного интерлейкина IL-10 [14]. Несмотря на значительную противоопухолевую активность в отношении гематологических видов рака, применение данного препарата для лечения солидных опухолей ограничено, в том числе, и в связи с его недостаточной эффективностью. В настоящее время изучается возможность применения SANA для лечения других типов онкологических заболеваний как в качестве монотерапии, так и в составе одного из компонентов комбинированной терапии.

Таким образом, получение полимерных наночастиц, содержащих воринонат, является актуальной задачей, поскольку позволит улучшить селективность накопления вориноната в клетках-мишенях, и, таким образом, увеличить эффективность химиотерапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение наночастиц ПЛГА, содержащих воринонат

166.6 мкл раствора вориноната в ДМСО (60 мг/мл) и добавляли к 0.458; 2.335; 4.583 мл (в зависимости от номера партии) CH_2Cl_2 . Точную навеску 50; 100; 150 мг (в зависимости от номера партии) ПЛГА растворяли в 0.625 мл; 2.5 мл; 4 мл (в зависимости от номера партии) CH_2Cl_2 на магнитной мешалке в течение 10 мин, затем растворы ПЛГА и вориноната объединяли и перемешивали на магнитной мешалке в течение 10 мин. В полученный раствор добавляли 0.5 мл водного раствора Poloxamer-188 (7 мг/мл), перемешивали 10 мин и проводили эмульгирование с помощью погружного гомогенизатора ULTRA TURRAX T25 basic на мощности 24000 об./мин 5 раз по 40 с и интервалами в 40 с между циклами. Полученную эмульсию по каплям добавляли к необходимому объему ($O/W_2 = 1/5$) 0.7; 1.5; 2.3 мас. % (в зависимости от номера партии) раствора поливинилового спирта (ПВС) и перемешивали 10 мин, после чего проводили эмульгирование с помощью ультразвукового гомогенизатора в режиме High+, Repeating duty Cycle 0.9, 5 раз по 40 с и интервалами в 40 с между циклами. Органический растворитель удаляли с помощью вакуумного роторного

испарителя Hei-VAP Advantage G3B ML в течение 50 мин при 120 об/мин и температуре водяной бани +37°C. Полученные частицы центрифугировали в течение 30 мин при 14000 об/мин и +4°C. Супернатант декантировали, осадок ресуспендировали в 10 мл дистиллированной воды и фильтровали через фильтр Шотта с пористостью 111 мкм, затем добавляли раствор D-маннита (10 мг/мл для достижения 10 мас. % к исходным загрузкам ПЛГА и вориноната), замораживали с использованием жидкого азота и лиофилизировали в течение суток. Лيوфилизат переносили в пластиковые контейнеры и хранили при +4°C.

Оптимизация технологических параметров получения наночастиц, содержащих воринонат

Для определения оптимальной технологии получения наночастиц, содержащих воринонат, было проведено 12 экспериментов, с помощью которых было оценено влияние трех независимых технологических параметров: масса ПЛГА (X_1), объем органической фазы (X_2) и концентрация поливинилового спирта (X_3) на общее содержание вориноната (Y_1) и размер частиц (Y_2).

Построения графиков поверхности отклика, а также математическая оптимизация были выполнены с помощью программного обеспечения Design Expert (версия 7.0.0, Stat-Ease Inc., США).

Определение среднего размера, дзета-потенциала и индекса полидисперсности (PDI) частиц

Размер частиц и PDI определяли методом динамического светорассеяния, дзета-потенциал – электрофоретическим методом. Из испытуемого образца готовили раствор с концентрацией 1 мг/мл. После чего проводили измерения с помощью анализатора Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 с использованием стандартизованного протокола исследования (SOP).

Определение общего содержания и степени включения вориноната

Для определения общего содержания вориноната в частицах использовали ранее разработанный и валидированный метод ВЭЖХ [15]. Анализ проводили на колонке Nucleodur C-18 Gravity (250 мм × 4.6 мм × 5 мкм). Образцы готовили, растворяя точную навеску частиц (около 3 мг) в 40 мкл диметилсульфоксида. К полученному раствору добавляли 960 мкл разбавителя для проб (ацетонитрил: 10 мМ KH_2PO_4 pH 3.9), раствор перемешивали и центрифугировали в течение 3 мин при 13400 об./мин и температуре 25°C. Супернатант переносили в вialу для хроматографирования и анализировали.

Таблица 1. Независимые параметры в планах Бокса–Бенкена

Независимые переменные	Обозначение	Уровень		
		–1	0	1
Масса ПЛГА, мг	X_1	50	100	150
Объем органической фазы, мл	X_2	1.25	5.00	8.75
Концентрация ПВС, масс. %	X_3	0.70	1.50	2.30

Для определения степени включения вориноста в полимерные частицы к точной навеске наночастиц (около 3 мг) добавляли 1 мл воды и суспендировали. Полученную суспензию центрифугировали Eppendorf 5417 R в течение 5 мин при 5000 об./мин и температуре 25°C. Осадок анализировали как описано выше.

Анализ морфологии полимерных частиц методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

Для проведения данного анализа раствор полимерных частиц наносили на свежеионизированные угольно-формваровые пленки-подложки, через 2 мин избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и препараты контрастировали 1% водным раствором ацетата уранила. Препараты просматривали в электронном микроскопе JEOL 100CX (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Негативы (увеличение в 20000–50000 раз) сканировали с разрешением 1200 dpi (dots per inch – точек на 1 дюйм).

Результаты экспериментов и их обсуждение

Наночастицы получали стандартным методом “двойного эмульгирования” [16]. Для определения оптимальной технологии получения наночастиц, содержащих вориноста, были выбраны уровни (интервалы) независимых технологических параметров (табл. 1–2) и спрогнозированы условия для получения 12 партий наночастиц. Затем было проведено 12 экспериментов, с помощью которых было оценено влияние трех независимых технологических параметров на общее содержание вориноста (Y_1) и размер частиц (Y_2) (табл. 3). Полученные партии наночастиц были проанализированы по таким физико-химическим параметрам, как средний размер (диаметр) частиц, индекс полидисперсности (PDI), дзета-потенциал и общее содержание (ОС) вориноста (табл. 3).

Впоследствии в статистическом модуле программы Design Expert были сгенерированы математические зависимости с помощью множественного регрессионного анализа. Экспериментальная взаимосвязь модели и переменных представлялась полиномиальными уравнениями первого и второго порядков. Рассчитанные значения скоррек-

тированного коэффициента корреляции ($Adj R^2$) составили 0.5105 и 0.5475, демонстрируя корреляцию между переменными отклика и зависимыми факторами. Для лучшего понимания взаимодействия между переменными отклика (X_1, X_2, X_3) и зависимыми факторами (Y_1, Y_2) были сгенерированы графики поверхности отклика (рис. 1).

Было определено, что при уменьшении массы ПЛГА и объема органической фазы возрастает общее содержание вориноста, но в то же время увеличивается размер частиц. Уменьшение концентрации ПВС приводит к увеличению общего содержания вориноста и диаметра частиц.

Была выполнена численная оптимизация в программе Design Expert, используя общую функцию желательности линейной шкалы, предложенную Derringer и Suich [17], для определения оптимальных условий получения наночастиц и прогнозируемых значений зависимых факторов, применяя условия максимального общего содержания вориноста в наночастицах ПЛГА и минимального среднего диаметра частиц. Максимальная желательность, равная 0.653, соответствовала условиям: масса ПЛГА (X_1) = 50 мг, объем органической фазы (X_2) = 2.50 мл, концентрация раствора ПВС (X_3) = 2.30 мас. %. Прогнозируемое содержание

Таблица 2. Технологические параметры получения наночастиц ПЛГА, содержащих вориноста, применяя трехуровневые трехфакторные планы Бокса–Бенкена

№ партии	X_1	X_2	X_3
1	100	8.75	2.3
2	100	1.25	2.3
3	50	5.00	2.3
4	150	5.00	2.3
5	150	8.75	1.5
6	50	1.25	1.5
7	150	1.25	1.5
8	50	8.75	1.5
9	150	5.00	0.7
10	100	1.25	0.7
11	50	5.00	0.7
12	100	8.75	0.7

Таблица 3. Физико-химические параметры полученных наночастиц ПЛГА, содержащих воринонат, после применения трехуровневых трехфакторных планов Бокса–Бенкена

№ партии	ОС вориноната (Y_1), масс. %	Средний диаметр (Y_2), нм	PDI	Дзета-потенциал, мВ
1	0.23	175.9 ± 0.2	0.066 ± 0.020	-16.4 ± 1.4
2	0.34	176.0 ± 2.0	0.057 ± 0.016	-16.6 ± 1.4
3	0.42	187.0 ± 0.4	0.073 ± 0.008	-13.7 ± 1.0
4	0.34	206.2 ± 1.2	0.046 ± 0.007	-19.6 ± 0.2
5	0.32	193.5 ± 0.5	0.069 ± 0.008	-16.6 ± 1.9
6	0.72	300.9 ± 2.4	0.473 ± 0.010	-18.8 ± 0.3
7	0.33	604.8 ± 6.4	0.804 ± 0.113	-19.3 ± 1.2
8	0.47	168.7 ± 1.8	0.103 ± 0.029	-19.3 ± 1.6
9	0.24	208.0 ± 2.4	0.112 ± 0.009	-12.8 ± 0.8
10	0.45	331.0 ± 10.4	0.490 ± 0.010	-12.5 ± 0.3
11	0.47	299.7 ± 1.9	0.321 ± 0.009	-13.2 ± 0.2
12	0.35	275.2 ± 5.4	0.248 ± 0.008	-13.5 ± 0.4

вориноната (Y_1) составило 0.51 масс. %, а средний размер наночастиц (Y_2) 203 нм.

В результате, по оптимизированной прогнозируемой методике были синтезированы и проанализированы наночастицы ПЛГА, содержащие воринонат (табл. 4, рис. 2).

По полученным результатам (табл. 4, рис. 2) можно сделать вывод, что синтезированные наночастицы ПЛГА, содержащие воринонат, соответствовали заявленным критериям: обладали минимальным размером при максимальном общем содержании вещества. Прогнозируемые отклики, рассчитанные с помощью программного

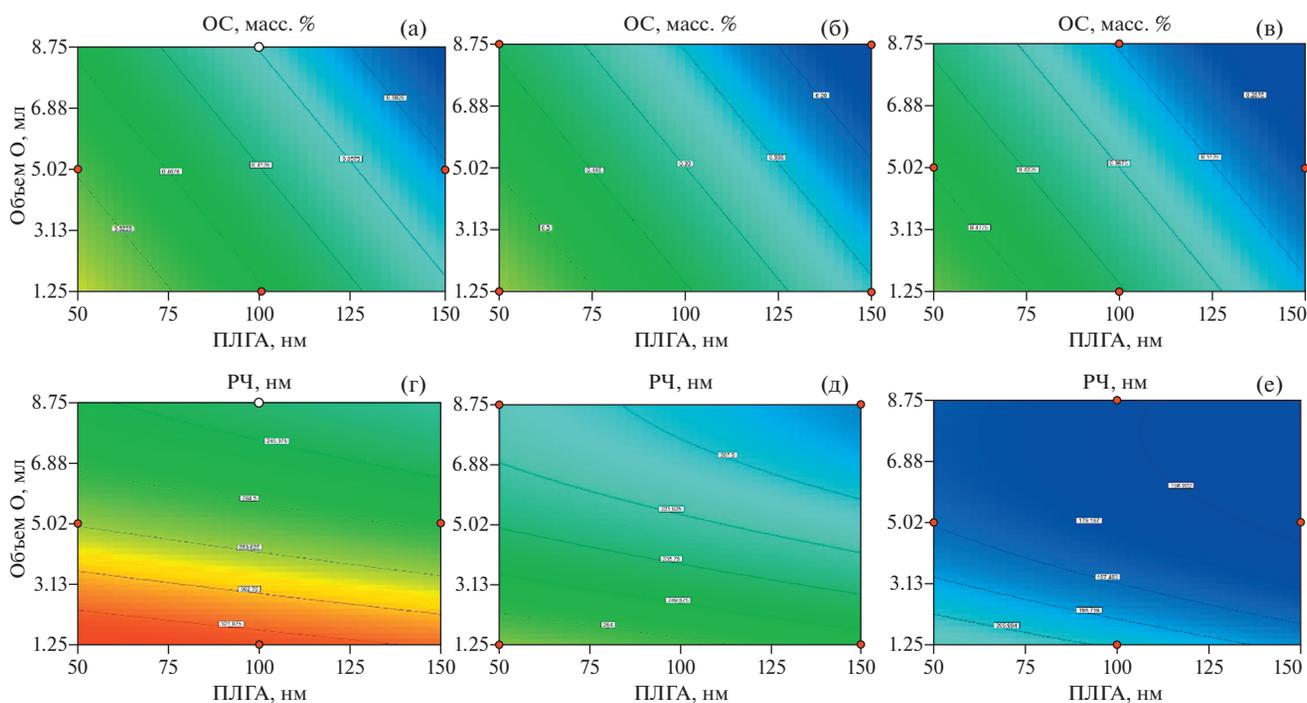


Рис. 1. Графики поверхности отклика общего содержания (ОС, мас. %) (а–в) и среднего диаметра частиц (PC, нм) (г–е) в зависимости от массы ПЛГА (ПЛГА, мг) и объема органической фазы (Объем О, мл) при постоянных значениях концентрации ПВС (а, г – 0.7 мас. %; б, д – 1.5 мас. %; в, е – 2.30 мас. %).

Таблица 4. Физико-химические параметры наночастиц ПЛГА, содержащих вориностат, полученных по оптимизированной методике

ОС вориностата, масс. %	Средний диаметр, нм	PDI	Дзета-потенциал, мВ
0.91	195.5 ± 2.7	0.089 ± 0.009	-22.3 ± 0.5

обеспечения Design Expert, были близки к экспериментальным значениям общего содержания вориностата и среднего размера частиц, подтверждая, что применяемый в данной работе подход является эффективным за счет оптимального количества проведенных экспериментов.

Применение планов Бокса–Бенкена позволяет проводить разработку технологии гораздо проще и быстрее, выявлять закономерности и оптимизировать параметры на основе полученных результатов с учетом вероятностных тестов, а также по прогнозированным значениям. Было показано, что синтезированные наночастицы, содержащие вориностат, обладают необходимыми физи-

ко-химическими характеристиками для эффективного проведения дальнейших биологических исследований *in vitro* и *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была получена новая наносомальная форма вориностата в виде полимерных наночастиц. Была разработана и оптимизирована технология получения наночастиц ПЛГА, содержащих вориностат, с помощью методики планирования экспериментов – трехфакторных и трехуровневых планов Бокса–Бенкена. Полученные полимерные частицы обладали моодисперсным распределением с оптимальным средним размером, способствующим

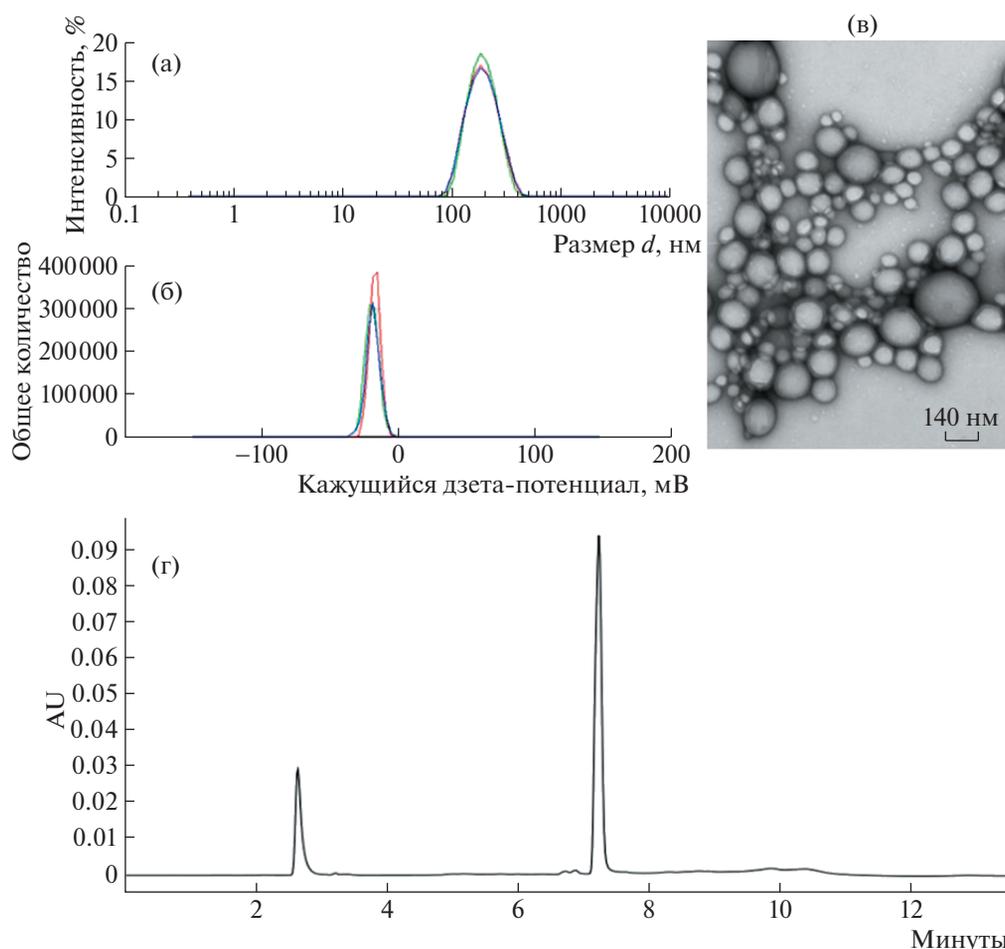


Рис. 2. Анализ наночастиц ПЛГА, содержащих вориностат, полученных по оптимизированной методике: (а) распределение по размерам, (б) распределение по дзета-потенциалу, (в) микрофотография частиц, полученная методом ПЭМ, (г) хроматограмма ВЭЖХ.

щим селективному накоплению в опухолевой ткани и в опухолевом микроокружении, а также дзета-потенциалом, обеспечивающим агрегационную устойчивость в водной суспензии. Синтезированные наночастицы являются перспективной системой доставки вориностата для проведения химиотерапии рака молочной железы как в виде монотерапии, так и в комбинированной терапии с другими препаратами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00293, <https://rscf.ru/project/22-25-00293/>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Arnold M., Morgan E., Rumgay H., et al. // *Breast*. 2022. V. 66. P. 15.
2. Nikolaou M., Pavlopoulou A., Georgakilas A., et al. // *Clin. Exp. Metastas.* 2018. V. 35 (4). P. 309.
3. Wu J. // *J. Personal. Med.* 2021. V. 11 (8). P. 771.
4. Subhan M.A., Yalamarty S.S.K., Filipczak N., et al. // *J. Personal. Med.* 2021. V. 11 (6). P. 571.
5. Ji X., Lu Y., Tian H., et al. // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 114. P. 108800.
6. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Yabbarov N.G., et al. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 278.
7. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Vasilenko E.A., et al. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43. P. 552.
8. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Yabbarov N.G., et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2017. V. 66. P. 1867.
9. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Sokol M.B., et al. // *Antib. Chemother.* 2017. V. 62. (3–4). P. 18. (in Russian).
10. Le V.K.H., Pham T.P.D., Truong D.H. // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2021. V. 61. P. 102334.
11. Mollaeva M.R., Yabbarov N.G., Sokol M.B., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22 (22). P. 12261.
12. Sharaf N.S., Shetta A., Elhalawani J.E. // *Polymers*. 2022. V. 14 (1). P. 144.
13. Hu H., Liao Z., Xu M., et al. // *ACS Omega*. 2022. V. 8 (1). P. 976.
14. Wawruszak A., Borkiewicz L., Okon E., et al. // *Cancers*. 2021. V. 13 (18). P. 4700.
15. Sokol M.B., Gulyaev I.A., Mollaeva M.R., et al. // *J. Sep. Sci.* 2023. V. 46 (3). P. e2200731.
16. Nikolskaya E.D., Sokol M.B., Faustova M.R., et al. // *Acta Bioeng. Biomech.* 2018. V. 20 (1). P. 65.
17. Costa N.R., Lourenco J., Pereira Z.L. // *Chemometr. Intell. Labor. Syst.* 2011. V. 107 (2). P. 234.

Design of SAHA-Loaded PLGA Nanoparticles Aimed to Use in Breast Cancer Combination Therapy

I. A. Gulyaev^{1, *}, M. B. Sokol¹, M. A. Klimenko¹, M. R. Mollaeva¹,
N. G. Yabbarov¹, M. V. Chirkina¹, and E. D. Nikolskaya^{1, **}

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

**e-mail: refuzors@yandex.ru*

***e-mail: elenanikolskaja@gmail.com*

Received May 30, 2023; revised June 10, 2023; accepted June 12, 2023

Abstract—In present work we have developed a method for synthesis of vorinostat-loaded nanoparticles based on a copolymer of lactic and glycolic acids. We optimized the method using Box-Banken design. The nanoparticles synthesized via the optimized technology had a spherical shape, which was confirmed by transmission electron microscopy. An average diameter of the nanoparticles was 196 nm, a polydispersity index was 0.089, and a zeta potential was -22.3 mV. The drug loading in the nanoparticles was 0.91 wt %, and the analysis was performed by high-performance liquid chromatography.

Keywords: vorinostat, SAHA, lactic-co-glycolic acid copolymer, PLGA, polymer particles, breast cancer, Box–Behnken design