

УДК 544.77

НОСИТЕЛИ НА ОСНОВЕ МИКРОЧАСТИЦ CaCO_3 : ОПТИМИЗАЦИЯ ЗАГРУЗКИ БЫЧЬЕГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА МЕТОДОМ КОПРЕЦИПИТАЦИИ

© 2025 г. Л. Бини^а, Д. Калениченко^{а, б, *}, И. Набиев^{а, б}, А. Суханова^а

^аУниверситет Реймса Шампань-Арденны, Реймс, 51100 Франция

^бНациональный исследовательский ядерный университет “МИФИ”, Москва, 115409 Россия

*E-mail: daria.kalenichenko@univ-reims.fr

Поступила в редакцию 17.06.2024 г.

После доработки 17.06.2024 г.

Принята к публикации 18.06.2024 г.

Онкологические заболевания, являющиеся одной из основных причин смерти во всем мире, требуют максимально избирательного лечения с минимизацией побочных эффектов. Иммуноterapia с использованием антител, распознающих иммунные контрольные точки, является перспективным подходом, но ограничена такими проблемами, как недостаточное проникновение противоракового средства в опухоль и, соответственно, терапевтическая резистентность раковых клеток. Применение биосовместимых и биоразлагаемых микрочастиц карбоната кальция в качестве носителей лекарственных средств позволяет решить эту проблему благодаря возможности инкапсулировать биомолекулы и контролировать их высвобождение, тем самым повышая их терапевтическую эффективность и снижая побочные эффекты. Настоящее исследование посвящено оптимизации синтеза микрочастиц карбоната кальция и загрузки в них, с использованием метода копреципитации, модельного белка — бычьего сывороточного альбумина. Разработанные подходы позволили получить белковые носители с улучшенными морфологическими характеристиками и достичь эффективности их загрузки белком превышающей 90%.

Ключевые слова: микрочастицы карбоната кальция, бычий сывороточный альбумин, носитель, копреципитация

DOI: 10.56304/S2079562925010026

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смерти во всем мире и представляют собой огромную проблему для общественного здравоохранения [1]. Традиционные методы лечения рака, включающие хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию, имеют ряд серьезных побочных эффектов для организма пациента, в частности, из-за своей неизбирательности при уничтожении раковых клеток. В последние годы активно ведется разработка новых методов адресной терапии и иммунотерапии, позволяющих избирательно поражать раковые клетки, не затрагивая здоровые клетки и ткани. Иммуноterapia показала себя как эффективный метод лечения рака, особенно при использовании антител или их фрагментов, специфичных к иммунным контрольным точкам [2], модифицируя иммунные клетки или микроокружение опухоли таким образом, чтобы иммунная система могла успешно уничтожать злокачественные новообразования. Несмотря на ряд преимуществ использования ан-

тител и их фрагментов в качестве иммунотерапевтических агентов, их применение в чистом виде имеет ряд ограничений, таких как недостаточное проникновение в опухоль и, соответственно, возможное развитие терапевтической резистентности [3, 4]. Решением этой проблемы может стать загрузка антител или их фрагментов в носитель на основе микрочастиц, для обеспечения их адресной доставки и пролонгированного высвобождения. Использование микрочастиц карбоната кальция в качестве таких носителей имеет ряд преимуществ, поскольку они биосовместимы, биоразлагаемы [5], подвержены рН-зависимой деградации [6] и имеют пористую структуру, что позволяет эффективно встраивать в них различные функциональные компоненты. Кроме того, можно легко синтезировать микрочастицы карбоната кальция с заданными свойствами поверхности, что позволяет оптимизировать их функциональность в сложных системах доставки лекарств, тем самым повышая терапевтическую эффективность [7] и уменьшая побочные эффекты [8]. Известно, что функцио-

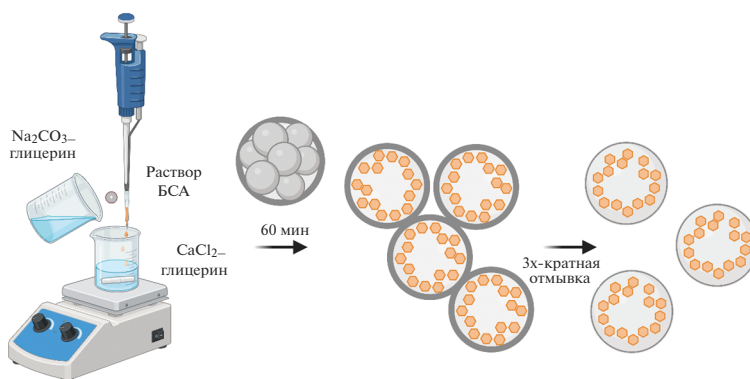


Рис. 1. Схема получения белоксодержащих микрочастиц методом копреципитации. Раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) добавляли к раствору CaCl_2 в глицерине, затем при перемешивании добавляли раствор Na_2CO_3 в глицерине. В процессе синтеза образовывались БСА-содержащие микропузырьки.

нализированные микропузырьки карбоната кальция демонстрируют возможность их высокоэффективной загрузки при сохранении биологической активности белков [9] и нуклеиновых кислот [10], а также позволяют проводить контролируемое высвобождение своего содержимого [8, 11, 12], в частности, при изменении pH [13–15]. Ранее было показано, что загрузка антител в микропузырьки карбоната кальция повышает их терапевтическую эффективность [16].

Целью настоящего исследования было оптимизировать условия синтеза микропузырьков карбоната кальция и методов включения в них белков для достижения максимальной эффективности загрузки. В качестве модельного белка в исследовании использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микропузырьки карбоната кальция со средним размером 2–3 мкм получали путем кристаллизации (осаждения) из смешанных эквимольных растворов Na_2CO_3 и CaCl_2 . В качестве загустителя в реакционную смесь добавляли глицерин до конечного содержания в реакционной смеси 22% (м/об), как описано ранее [15]. Предварительно готовили два раствора, по отдельности смешивая заданные количества CaCl_2 и Na_2CO_3 с глицерином. Белоксодержащие микропузырьки карбоната кальция получали путем добавления 1 мл раствора БСА (5, 10 или 20 мг/мл) к раствору CaCl_2 (рис. 1). Затем к смеси CaCl_2 быстро добавляли раствор Na_2CO_3 при энергичном перемешивании со скоростью 500 об/мин в течение 60 мин при комнатной температуре. После перемешивания смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Полученные микропузырьки, содержащие белок, трижды промывали в сверхчистой воде.

Количество белка в полученных микропузырьках измеряли спектрофотометрически с помощью многорежимного микропланшетного ридера Nano Quant of Spark™ 10M (Tecan, Швейцария). Для этого $5 \cdot 10^7$ микропузырьков, содержащих БСА, обрабатывали 0.2 М ЭДТА (pH 8.0) при комнатной температуре в течение 4 ч. Эффективность загрузки рассчитывали как разницу между исходным количеством белка, использованного для загрузки в микропузырьки, и количеством белка, оставшегося после растворения микропузырьков.

Морфологические характеристики полученных микропузырьков — форму, структуру и распределение по размерам — анализировали методами динамического светорассеяния с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical), а также оптической и сканирующей электронной микроскопии с помощью микроскопа Axio Observer 3 (Carl Zeiss, Германия) и сканирующего электронного микроскопа SU8030 (Hitachi, Япония) с полевой эмиссионной пушкой, соответственно. Заряд поверхности микропузырьков определяли методом лазерного доплеровского микроэлектрофореза с использованием прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования систем на основе карбоната кальция для контролируемого высвобождения терапевтических препаратов свидетельствуют о важности понимания структурных характеристик таких материалов, а также оптимизации условий их синтеза и функционализации с целью обеспечения максимальной загрузки и стабильности белков [8].

Показано, что такие факторы, как концентрация белка, pH и температура существенно влияют на морфологию и количество осажденного CaCO_3 , что подчеркивает их важность для оптимизации мак-

Таблица 1. Морфологические характеристики полученных микрочастиц*

Образец микрочастиц	Диаметр, мкм		ζ -потенциал	Общее количество микрочастиц
	динамическое светорассеяние	оптическая микроскопия		
без БСА	2.08 ± 0.55	2.58 ± 0.68	-3.66 ± 0.87	$5.21 \cdot 10^9$
5 мг/мл БСА	2.89 ± 0.92	2.94 ± 0.55	-24.4 ± 1.42	$2.59 \cdot 10^{10}$
10 мг/мл БСА	2.96 ± 0.75	2.26 ± 0.45	-25.8 ± 1.53	$1.86 \cdot 10^{10}$
20 мг/мл БСА	2.80 ± 0.60	2.71 ± 0.46	-21.2 ± 1.82	$1.77 \cdot 10^{10}$

* Среднее из трех измерений.

симальной загрузки белка [17]. Точный подбор концентрации БСА имеет решающее значение для обеспечения максимальной эффективности загрузки и стабильности микрочастиц [18].

Полученные микрочастицы карбоната кальция, не содержащие белка, имели сферическую форму, средний размер 2.08 ± 1.8 мкм и небольшой отрицательный ζ -потенциал (-3.66 ± 0.87 мВ, табл. 1). Для получения белоксодержащих микрочастиц в реакционную смесь добавляли раствор БСА с концентрацией 5, 10 или 20 мг/мл. Одним из преимуществ добавления белка на стадии синтеза микрочастиц является возможность равномерного включения белка по всей структуре микрочастиц за счет его адсорбции в порах матрицы при формировании микрочастиц на стадии их созревания (рис. 1). Синтезированные БСА-содержащие микрочастицы карбоната кальция имели большой отрицательный поверхностный заряд, сферическую форму и размер от 2.80 до 2.96 мкм (табл. 1, рис. 2). Эти данные свидетельствуют о том, что добавление БСА значительно изменяет поверхностный заряд и может влиять на распределение и стабильность микрочастиц в суспензии.

Эффективность загрузки БСА была наибольшей ($\sim 91.3 \pm 3.05\%$) в случае добавления небольшого количества БСА в реакционную смесь (рис. 3).

При увеличении количества БСА в смеси (до 10 и 20 мг/мл) средняя эффективность загрузки не превышала 50% (рис. 3). Наблюдаемое снижение эффективности загрузки БСА при высоких концентрациях может быть связано с достижением максимума внутренней насыщающей способности пористых микрочастиц карбоната кальция. Таким образом, загрузка была наиболее эффективной при концентрации БСА в реакционной смеси 5 мг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании разработаны белоксодержащие микрочастицы карбоната кальция, а также определены оптимальные условия для загрузки белка в микрочастицы, при использовании БСА в качестве модельного объекта. Результаты исследования показали, что белки могут быть эффективно загружены в гомогенные микрочастицы карбоната кальция методом копреципитации, при достижении эффективностей загрузки, превышающих 90%. Разработанный метод получения носителей, содержащих белок, может быть использован для создания иммунотерапевтических препаратов на основе микрочастиц карбоната кальция.

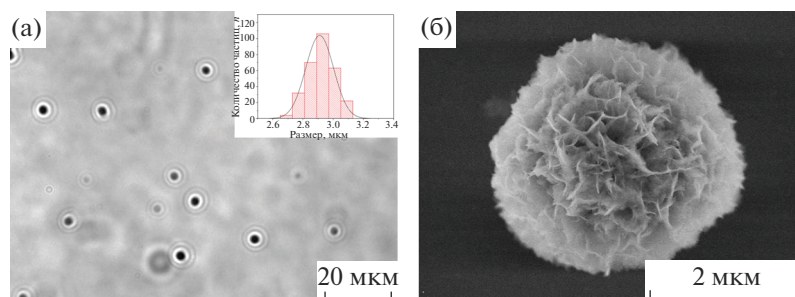


Рис. 2. Микрофотографии микрочастиц карбоната кальция, содержащих бычий сывороточный альбумин (БСА), полученных при концентрации БСА в реакционной смеси 5 мг/мл: оптическая микроскопия (а); сканирующая электронная микроскопия (б).

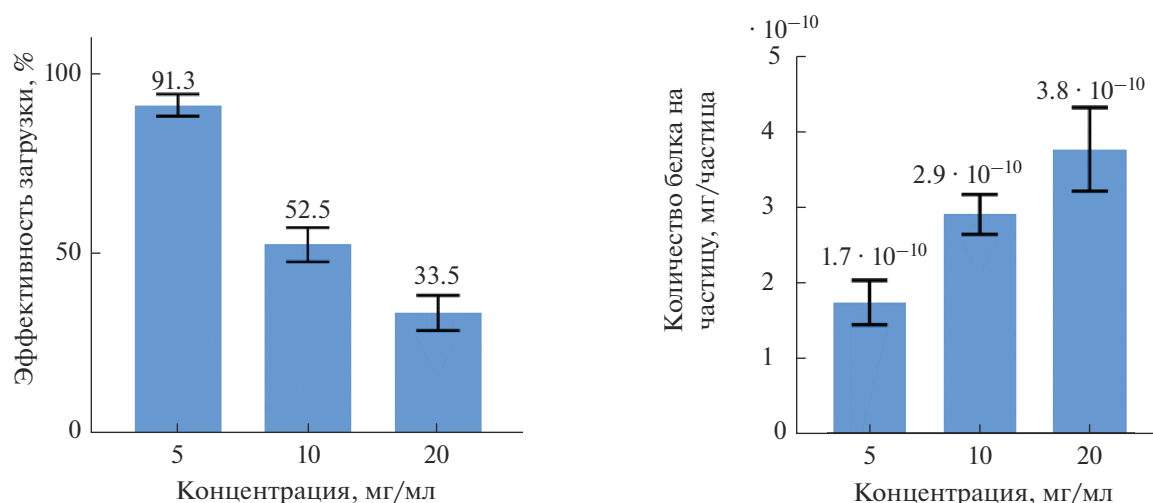


Рис. 3. Эффективность загрузки и количество бычьего сывороточного альбумина в микрочастицах, полученных методом копреципитации.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-75-10103, в части работы, связанной с синтезом микрочастиц, а также грантом № 21-79-30048, части работы, связанной с функционализацией микрочастиц. Аспирант Л. Бини была поддержана стипендией от Университетской исследовательской Школы NANO-PHOT университета Труа, Франция (PIA3, контракт ANR-18-EURE-0013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/REFERENCES

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. // *CA-Cancer J. Clin.* 2021. V. 71 (3). P. 209.
2. Sanmamed M.F., Berraondo P., Rodriguez-Ruiz M.E., Melero I. // *Nat. Cancer.* 2022. V. 3 (6). P. 665.
3. Yang E.Y., Shah K. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 1182.
4. Castrignano C., Di Scipio F., Franco F., Mognetti B., Berta G.N. // *Pharmaceuticals.* 2023. V. 16 (6). P. 794.
5. Sukhorukov G.B., Volodkin D.V., Günther A.M., Petrov A.I., Shenoy D.B., Möhwald H. // *J. Mater. Chem.* 2004. V. 14 (14). P. 2073.
6. Svenskaya Y., Pallaeva T. // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. P. 2574.
7. Niu Y.Q., Liu J.H., Aymonier C., Fermani S., Kralj D., Fali ni G., et al. // *Chem. Soc. Rev.* 2022. V. 51 (18). P. 7883.
8. Li S., Lian B. // *Minerals.* 2023. V. 13 (9). P. 1136.
9. Roth R., Schoelkopf J., Huwyler J., Puchkov M. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 122. P. 96.
10. Alford A., Tucker B., Kozlovskaya V., Chen J., Gupta N., Caviedes R., et al. // *Polymers.* 2018. V. 10 (12). P. 1342.
11. Parakhonskiy B.V., Haase A., Antolini R. // *Angew. Chem., Int. Ed.* 2012. V. 51. P. 1195.
12. Balabushevich N.G., Kovalenko E.A., Le-Deygen I.M., Filatova L.Y., Volodkin D., Vikulina A.S. // *Mater. Des.* 2019. V. 182. P. 108020.
13. Wei Y., Sun R., Su H., Xu H., Zhang L., Huang D., et al. // *Colloids Surf. B.* 2021. V. 199. P. 1115.
14. Yoshida K., Ono T., Kashiwagi Y., Takahashi S., Sato K., Anzai J.I. // *Polymers.* 2015. V. 7. P. 1269.
15. Kalenichenko D., Nifontova G., Karaulov A., Sukhanova A., Nabiev I. // *Nanomaterials.* 2021. V. 11. P. 3055.
16. Lu J., Jiao Y., Cao G., Liu Z. // *Chem. Eng. J.* 2021. V. 420. P. 129746.
17. Haystead J., Gilmour K., Sherry A., Dade-Robertson M., Zhang M. // *J. Appl. Microbiol.* 2024. V. 135 (1). P. 309.
18. Duranoğlu D., Yün M.K. // *Phys. Scr.* 2023. V. 99 (1). P. 015003.

CaCO₃ Microparticle-Based Carriers: Optimization of BSA Loading by Coprecipitation

L. Biny¹, D. Kalenichenko^{1, 2, *}, I. Nabiev^{1, 2}, and A. Sukhanova¹

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, 51100 France

² National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, 115409 Russia

*e-mail: daria.kalenichenko@univ-reims.fr

Received June 17, 2024; revised June 17, 2024; accepted June 18, 2024

Abstract—Cancer, a major global cause of death, requires more selective treatments to minimize side effects. Immunotherapy that uses antibodies targeting immune checkpoints is a promising approach, but it has lim-

itations, mainly related with poor tumor penetration and consequent treatment resistance. Biocompatible and biodegradable calcium carbonate microparticles offer a solution to this problem due to the possibilities of encapsulation and controlled release of these biomolecules, which increase their therapeutic efficacy while reducing adverse effects. This study focuses on optimizing the synthesis of these microparticles and improving protein loading with the use of the coprecipitation approach, with bovine serum albumin as a model protein. The procedures developed make it possible to obtain protein carriers with improved morphological characteristics and a loading efficiency of more than 90%.

Keywords: calcium carbonate microparticles, bovine serum albumin, carrier, coprecipitation