

УДК 615.456.5

Микрочастицы из низкомолекулярного поли-(3-гидроксибутирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания

А.Л. Зернов¹, А.П. Бонарцев^{1,2}, С.Г. Яковлев¹, В.Л. Мышкина¹, Т.К. Махина¹,
Е.С. Паршина², Е.П. Харитонов³, Г.А. Бонарцева¹, К.В. Шайтан²

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

E-mail: zernovanton89@gmail.com

Поступила в редакцию: 22.06.2016

Принята в печать: 13.12.2016

Микрочастицы из биосовместимых и биodeградируемых полимеров – это современные лекарственные формы, способные элиминировать побочные эффекты и неудовлетворительную фармакокинетику уже существующих лекарственных препаратов. В этой работе мы разработали высокотехнологичный масштабируемый метод получения микрочастиц, загруженных паклитакселом, на основе поли-(3-гидроксибутирата) (ПГБ). Данные частицы получали на распылительной сушилке Buchi Nano Spray Dryer B-90 методом пьезоэлектрического распылительного высушивания в инертной атмосфере. Правильная сферическая форма, узкое распределение по размерам, а также удовлетворительные результаты высвобождения паклитаксела из полимерной матрицы микрочастиц *in vitro* делают эту полимерную лекарственную форму перспективной для ее будущего применения в фармацевтике. Для сравнения были использованы наночастицы аналогичного состава, полученные с помощью лабораторного метода одноэтапного эмульгирования. Это исследование является первым этапом для создания противоопухолевого препарата паклитаксела пролонгированного действия

LOW MOLECULAR WEIGHT POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) MICROPARTICLES SYNTHESIZED BY PIEZOELECTRIC SPRAY DRYING FOR THE SUSTAINED RELEASE OF PACLITAXEL

Biocompatible and biodegradable polymer microparticles are contemporary medicines able to eliminate the side effects and unsatisfactory pharmacokinetics of already existing preparations. In this work we have developed a high-tech scalable method for the synthesis of paclitaxel-loaded poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-based microparticles. These particles were synthesized on a B-90 Buchi nano spray dryer by piezoelectric spray drying in an inert atmosphere. A regular spherical shape, narrow size distribution, and satisfactory results for the release of paclitaxel from the polymeric matrix of microparticles *in vitro* make this polymeric medicinal form promising for its further application in pharmaceuticals. Nanoparticles with a similar composition synthesized via the laboratory one-stage emulsification method were used for comparison. This study is the first stage in the creation of a sustained-action anticancer paclitaxel preparation.

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапия в наше время остается основным способом лечения злокачественных образований различной природы. Одним из наиболее широко применяемых противоопухолевых лекарственных веществ (ЛВ) является паклитаксел (ПКЛ) – цитостатик, относящийся к таксанам, впервые выделенный из коры тихоокеанского тиса, *Taxus brevifolia*. В своей традиционной лекарственной форме с кремофором – полиоксиэтилированным касторовым маслом в качестве солюбилизатора активного лекарственного вещества, препарат обладает терапевтической эффективностью, но имеет высокую токсичность и может вызывать серьезные побочные эффекты [1, 2].

В общем случае, для большинства химиотерапевтических препаратов в виде традиционных лекарственных форм довольно характерно неполное раскрытие терапевтического потенциала, с одной стороны, при сохранении их негативных побочных эффектов, с другой. Часто они демонстрируют низкую биодоступность в сочетании с высокой токсичностью, из-за чего препарат необходимо использовать в неэффективных дозах, вследствие риска серьезных побочных эффектов. Кроме того, обычно требуется несколько инфузионных введений препарата для достижения значительного резуль-

тата такого лечения и поддержания фармакокинетических показателей на требуемом уровне [3]. Одним из подходов к решению этой проблемы является использование систем пролонгированного высвобождения лекарственного вещества из полимерных микро- и наночастиц [4, 5]. Связывание препарата в полимерных микрочастицах и его пролонгированное высвобождение с постоянной скоростью открывает возможности к увеличению эффективной дозы и обеспечивает долгосрочное поддержание требуемой концентрации действующего вещества в опухоли. Это позволяет в какой-то мере исключить системные побочные эффекты во время посттерапевтического периода. Также это убирает необходимость в дополнительном многократном введении препарата, упрощает его применение, улучшает фармакокинетику и биодоступность и снижает локальные побочные эффекты препарата. Тем не менее, разрабатываемые и исследуемые в настоящее время лекарственные формы на основе полимерных микро- и наночастиц также часто имеют существенные недостатки, в частности, это токсичность из-за низкой биологической совместимости используемых полимеров, неудовлетворительная кинетика высвобождения лекарственного средства и биodeградация микрочастиц, которые сложно регулировать [6, 7].

Поэтому в последнее время биоразлагаемые и биосовместимые полимеры микробиологического происхождения, такие, как поли-(3-гидроксibuтират) (ПГБ) и его сополимеры, все чаще исследуются с целью разработки новых систем эффективной доставки химиотерапевтических препаратов [8, 9]. Ранее было показано, что ПГБ имеет высокую биосовместимость и способность как к гидролитической и ферментативной деградации *in vitro*, так и к биологическому разложению в тканях млекопитающих *in vivo* [10, 11]. Кроме того, показана способность ПГБ к формированию сополимеров и композитов с другими полимерами, что позволяет изменить физико-химические свойства полимера в широких пределах и тем самым влиять на характер его взаимодействия с препаратом [11–13]. Это, в свою очередь, делает возможным регулировать кинетику высвобождения лекарственного средства из полимерных микрочастиц, тем самым изменяя их фармакокинетические свойства. Такой подход позволит создать новые полимерные лекарственные формы, основанные на полимерных микро- и наночастицах с широким спектром фармакокинетических характеристик, которые важно учитывать при выборе лечения того или иного заболевания.

До недавнего времени наиболее широко применяемым методом изготовления таких микро- и наночастиц было одно- или двухэтапное эмульгирование. Наиболее часто использовался метод одноэтапного эмульгирования «масляная фаза/водная фаза» (O/W), который заключается в эмульгировании комбинированного раствора полимера и ЛВ в органическом растворителе (масляная фаза) в водной фазе с эмульгатором, последующем постепенном выпаривании органического растворителя при интенсивном перемешивании или ультразвуковом воздействии, осаждении и высушивании биополимерных микрочастиц [14]. Однако такие методы плохо масштабируются для производства препаратов вне лабораторных условий. Альтернативой такому подходу является получение полимерных частиц с помощью распылительного спрей-высушивания [15].

Таким образом, целью данной работы было создание и изучение системы пролонгированного высвобождения паклитаксела на основе микрочастиц из ПГБ, полученных методом пьезоэлектрического распылительного высушивания, а также проведено их сравнение с наночастицами аналогичного состава, полученными с помощью лабораторного метода прямого мембранного эмульгирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

•МАТЕРИАЛЫ

Для изготовления частиц мы использовали биополимер поли-(3-гидроксibuтират) (ПГБ) низкой молекулярной массы (~6000 Да), полученный микробиологическим путем с использованием штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б [16], и паклитаксел, полученный из LC labs (США). Кроме того, в работе использовался хлороформ (Экос-1, Россия) как растворитель, Твин-80 (Sigma Aldrich, Германия) как дополнительное вещество. Газы N₂ и CO₂ категории «ос. ч.» были использованы для создания бескислородной атмосферы внутри прибора при изготовлении микрочастиц. Также были использованы 25 мМ калий-фосфатный буфер с добавлением азида натрия (Sigma Aldrich, Германия).

•МЕТОДЫ

••БИОСИНТЕЗ ПОЛИ-(3-ГИДРОКСИБУТИРАТА)

Биосинтез ПГБ проводился по оригинальной методике, разработанной в нашей лаборатории и описанной ранее [17].

Вкратце: культуру *Azotobacter chroococcum* 7Б выращивали на среде Берка с сахарозой, как первичным источником углерода. Культивирование проводили в течение 72 ч. По истечении этого срока клетки осаждались центрифугированием при дальнейшем экстрагировании полимера хлороформом.

••ГИДРОЛИТИЧЕСКОЕ СНИЖЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ

Молекулярная масса полученного полимера была снижена путем кислого гидролиза выделенного полимера в растворе хлороформа [18]. Раствор ПГБ титровался хлороформным раствором соляной кислоты при постоянном перемешивании. В пробах, отбирившихся с заданным временным интервалом, вискозиметрически определялась молекулярная масса содержащегося полимера с помощью уравнения Марка–Куна–Хаувинка. Гидролиз был остановлен нейтрализацией раствора по достижении значения молекулярной массы 6000 Да.

••ПРИГОТОВЛЕНИЕ МИКРОЧАСТИЦ

Микрочастицы были приготовлены по методике ультразвукового пьезоэлектрического мембранного распылительного высушивания в бескислородной атмосфере [19]. На первом этапе ПГБ и паклитаксел были растворены в хлороформе в соотношении 90 % биополимера к 10 % ЛВ. Конечная концентрация этой композиции была 50 мг/мл. Однако было выяснено, что без добавления каких-либо сурфактантов получались лишь несuspendируемые в воде, слипшиеся частицы. Именно поэтому было решено добавить Твин-80 в соотношении 1 : 1000 к композиции. Полученный раствор был профильтрован через стеклянный фильтр (маркировка 3) и загружен в распылительную сушилку Buchi Nano Spray Drier В-90 (Buchi, Швейцария). Объем одной загрузки был выбран 50 мл. Для создания бескислородной среды были использованы газы N₂ и CO₂ категории «ос. ч.». На приборе были выбраны следующие параметры (табл. 1).

Следует отметить, что температура осушающего воздуха была выбрана равной температуре кипения растворителя – хлороформа. После распылительного высушивания частицы были собраны специальным шпателем (Buchi electrostatic particle collector) и оставлены на ночь под вакуумом для удаления остатков хлороформа.

В качестве контроля были получены микрочастицы, не загруженные паклитакселем.

Важно отметить, что данная методика позволяет получать микрочастицы с помощью метода распылительного высушивания минимального размера.

••ПРИГОТОВЛЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ

Полимерные наночастицы с включением ПКЛ были получены методом прямого мембранного эмульгирования. Хлороформный раствор ПКЛ и ПГБ пропускали с помощью экструдера Mini-Extruder Avanti (Polar Lipids Inc.) через мем-

ТАБЛИЦА 1 | Параметры процесса распылительного высушивания

Технологический параметр процесса	Значение параметра
Уровень подачи осушающего газа	120 л/мин
Температура подаваемого осушающего газа	61 °С
Давление внутри прибора	53 мбар
Диаметр распылительных отверстий	7 мкм

бренные фильтры Omnipore (Millipore, Ирландия) с диаметром пор 100 нм в водную среду (1.5 % р-р ПВС). Полученную эмульсию добавляли к 40 мл 1.5 % раствора поливинилового спирта при перемешивании со скоростью 26000 об/мин на гомогенизаторе SilentCrusher M (Heidolph, Германия). Полученную смесь центрифугировали 15 мин при 14000 об/мин с использованием MiniSpin (Eppendorf, Германия) и отмывали дистиллированной водой от остатков ПВС. Очищенный раствор наночастиц лиофилизировали с помощью лабораторной лиофильной сушки ALPHA 1-2LD plus (Martin Christ, Германия).

Данная методика позволяет получать частицы из ПГБ с помощью метода эмульгирования минимального размера.

••ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРО- И НАНОЧАСТИЦ

Размер частиц и их морфология были изучены с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) JSM-6380LA (JEOL, Япония), а также Quanta 200 3D (FEI Company, США). Диаметры частиц были определены с использованием программы ImageJ 1.46. Гидродинамический диаметр и ζ -потенциал были определены с помощью метода динамического светорассеяния (DLS) в водном растворе на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Загрузка частиц ПКЛ определялась следующим образом: навеска нескольких миллиграммов частиц растворялась в хлороформе, а затем спектрофотометрически определялось содержание паклитаксела в пробе. Спектры поглощения были получены на УФ-спектрофотометре UV-1601PC (Shimadzu, Япония) (максимумы поглощения ПКЛ: 242 и 278 нм), после чего полученные данные сравнивали с контрольными растворами ПГБ в хлороформе и калибровочной кривой растворов ПКЛ в хлороформе при различных концентрациях [20].

••ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ВЕЩЕСТВА IN VITRO

Экспериментальное исследование пролонгированного высвобождения ПКЛ из микро- и наночастиц *in vitro* проводилось при 37 °С в 25 мМ калий-фосфатном буфере (рН = 7.4) с небольшим добавлением эмульгатора (0.1 % Твин-80). Шесть образцов микрочастиц и 6 образцов наночастиц по 20 мг частиц в 4 мл буфера помещали в термостат (ТС-1/20, Россия) при 37 °С на орбитальной шейкер (OC-10 Biosan, Латвия). Т.е. исследовали высвобождение ПКЛ из твердых полимерных микро-/наночастиц в жидкую фазу водной дисперсии микро-/наночастиц. В определенные моменты времени образцы буфера с высвободившимся ПКЛ отделяли от частиц центрифугированием смеси при 14000 оборотов в минуту (5702 R центрифуги, Eppendorf, Германия) и анализировали их спектрофотометрически на содержание ЛВ. Полученные данные использовались для построения кинетических профилей высвобождения. Удаленная среда заменялась равным объемом свежей среды после каждого отбора проб. УФ-анализ образцов проводился как было описано ранее с использованием УФ-спектрофотометра UV-1601PC (Shimadzu, Япония). Остаточное содержание ПКЛ в микро- и наночастицах также определяли спектрофотометрически путем растворения их в хлороформе.

••ИЗМЕРЕНИЕ СТЕПЕНИ КРИСТАЛЛИЧНОСТИ МИКРО- И НАНОЧАСТИЦ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ КАЛОРИМЕТРИЕЙ (ДСК)

Термофизические свойства микрочастиц, полученных методом электродинамического спрей-высушивания, а также наночастиц, полученных методом прямого мембранного эмульгирования, были измерены с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии при помощи DSC 204 F1 Phoenix (Netzsch, Германия). Навеску частиц массой 1–4 мг

помещали в 25 мкл алюминиевого тигля. Образцы нагревали от 25 до 200 °С при скорости нагрева 10 °С/мин в атмосфере азота. Для точной калибровки температуры и энтальпии в диапазоне температур от –100 до 600 °С в соответствии с инструкциями производителя был использован калибровочный набор Netzsch (образцы высокой чистоты KNO₃, In, Bi, Sn, Zn, CsCl, Hg, C₆H₁₂). Температуры начала и пика изменения теплоемкости были обозначены как точки плавления T_п^{нач} и T_п^{пик}. Кристалличность структур (X_c) может быть рассчитана следующим образом [21]:

$$X_c = (\Delta H_m + \Delta H_r) / \Delta H_{0m}(\text{ПОБ}) \times 100 \%,$$

где ΔH_r и ΔH_m – изменения энтальпии, вызванные рекристаллизацией и плавлением исследуемого образца соответственно, ΔH_{0m} (ПОБ) – теоретическое значение для термодинамической энтальпии плавления, которое было бы получено для 100 % кристаллических образцов ПОБ (146.6 Дж/г) [22]. Все расчеты проводились для первого цикла нагрева [21, 23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

••БИОСИНТЕЗ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ПОЛИМЕРА

Поли-(3-гидроксипропанат) – полиэфир оксималяной кислоты – это биосовместимый полимер, разлагающийся в организме до нетоксичных продуктов под действием гидролитических ферментов. Он хорошо применим для создания широкого спектра биомедицинских изделий. Кроме того, в отличие от таких его аналогов, как полилактиды и их сополимеры, ПГБ является полностью биосинтетическим продуктом, что обуславливает более высокую степень его чистоты, а значит и меньший вред организму [24]. Для биосинтеза данного полимера в нашей лаборатории был выведен штамм *Azotobacter chroococcum* 7Б, способный накапливать в себе ПГБ до 85 % сухого веса биомассы. При этом полимер, полученный при экстракции биомассы хлороформом, имел высокую молекулярную массу – 1 500 кДа. Однако для обеспечения технологического процесса создания микрочастиц столь высокая молекулярная масса не подходит. Дело в том, что процесс создания структур, который будет описан ниже, подразумевает работу с невязкими растворами веществ, в то время как растворы ПГБ более 150 кДа обладают повышенной вязкостью. Для получения низкомолекулярного полимера стоковый раствор ПГБ был подвергнут кислоте гидролизу. В качестве гидролитического агента была выбрана соляная кислота. Результаты вискозиметрического измерения молекулярной массы приведены на рис. 1. Высокая скорость прохождения гидролиза полимерной цепи связана с тем, что эфирные связи при нахождении ПГБ в состоянии раствора открыты, в то время как в твердом конденсированном состоянии полимерная цепь ПГБ упакована в виде ламеллярных структур [25]. Таким образом, был получен полимер, обладающий заданными характеристиками, необходимыми для обеспечения создания микроструктур.

••ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРО- И НАНОЧАСТИЦ

В данной работе были исследованы частицы с включением паклитаксела, полученные методом распылительного высушивания [15]. Для их создания использовался прибор Buchi Nano Spray Dryer B-90 (Швейцария). Вкратце, это устройство имеет распылительную головку, помещенную в аэродинамическую трубу. На головке расположена форсунка с мембранной, имеющей отверстия определенного диаметра (в данном случае 7 мкм). С помощью перистальтического насоса, раствор вещества подается на резонирующую мембрану. Процесс

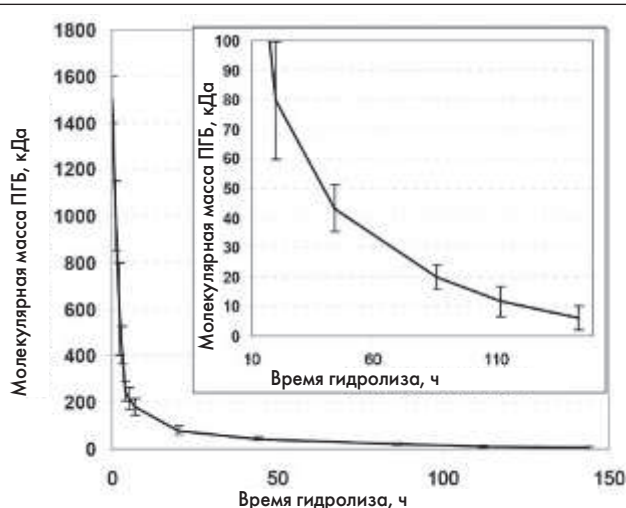


РИСУНОК 1 | Ход гидролитического разложения высокомолекулярного ПГБ. На вставке более крупно изображен начальный промежуток времени

вибрации, необходимый для распыления капель раствора с головки, обеспечивается за счет обратного пьезоэффекта. Затем полученные капли заданного диаметра, равного размеру отверстий, проходят по аэродинамической трубе, где происходит их высушивание. К концу прохождения трубы они уже являются твердыми микрочастицами. В конце трубы установлен коллектор для готовых микрочастиц, где они осаждаются на металлический цилиндр за счет статического электричества, подаваемого на него (схема). Для адаптации этого метода и прибора для работы с хлороформным раствором ПГБ и ПКЛ была использована система инертных газов N_2 и CO_2 .

Таким образом, были получены микрочастицы из ПГБ (молекулярная масса 6000 Да) диаметром 2.71 ± 1.01 мкм с включением паклитаксела (табл. 2). Были также получены контрольные микрочастицы, не содержащие лекарственное вещество. Их диаметр также приблизительно равнялся 3 мкм. На рис. 2 показаны изображения микрочастиц, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа. Микроструктуры имеют правильную сферическую форму с относительно гладкой поверхностью. Распределение частиц по размерам, полученное с использованием ImageJ 1.46 показано на гистограмме (рис. 3). Здесь можно видеть узкую дисперсию по размеру частиц, который показывает их единообразие. Микрочастицы, загруженные ПКЛ, показали хоро-

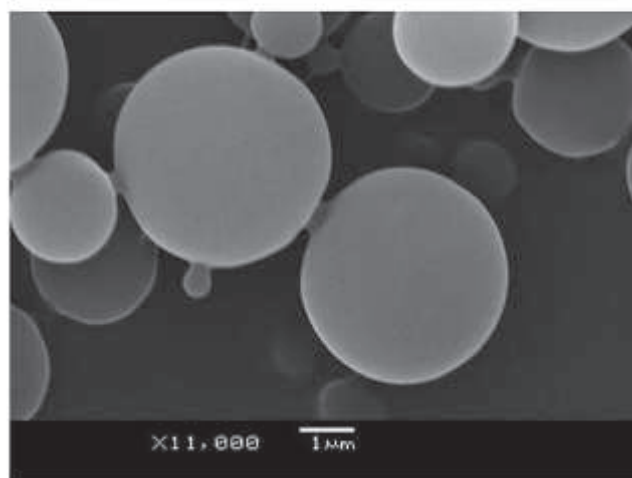
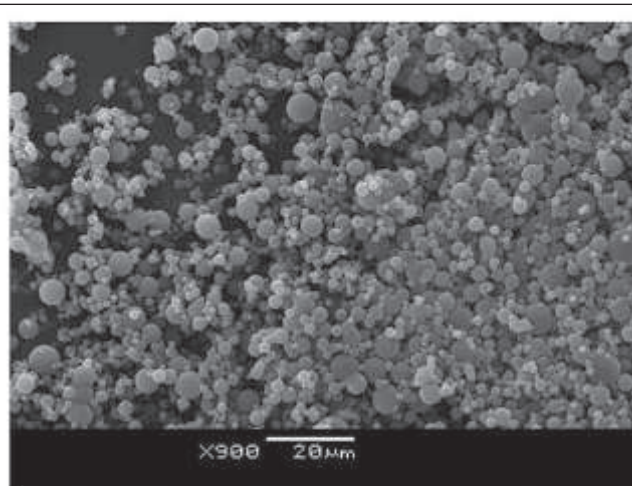


РИСУНОК 2 | СЭМ-изображение микрочастиц, изготовленных из ПГБ 6000 Да с инкапсулированным паклитаксолом

шую способность к диспергированию. Гидродинамический диаметр и поверхностный заряд (ζ -потенциал) равнялись 7.86 мкм и -42 мВ для загруженных микрочастиц и 7.48 мкм и -41 мВ для пустых (табл. 2).

Было показано, что размер частиц и другие характеристики инкапсулирования зависят от природы полимера и от ряда факторов и условий формирования микрочастиц [27]. Например, было обнаружено, что наиболее важным фактором, отвечающим за размер микрочастиц, является суммарная концентрация распыляемых веществ в растворе. Кроме

ТАБЛИЦА 2 | Размер и физико-химические свойства полученных микро- и наночастиц

Параметр	Наночастицы	Микрочастицы
Методика приготовления	Двухэтапное эмульгирование	Электродинамическое высушивание
Диаметр по данным СЭМ	216 ± 52 нм	2.71 ± 1.01 мкм
Гидродинамический диаметр	351 ± 74 нм	7.86 ± 0.45 мкм
ζ -потенциал, мВ	-9.43	-42
Включение лекарственного вещества, %	10.5 ± 1.2	12.6 ± 0.7
Температура плавления $T_{п\text{нач.}} / T_{п\text{пик.}}$, °C	132.0 / 157.3	133.9 / 155.2
Кристалличность	65.0	65.0

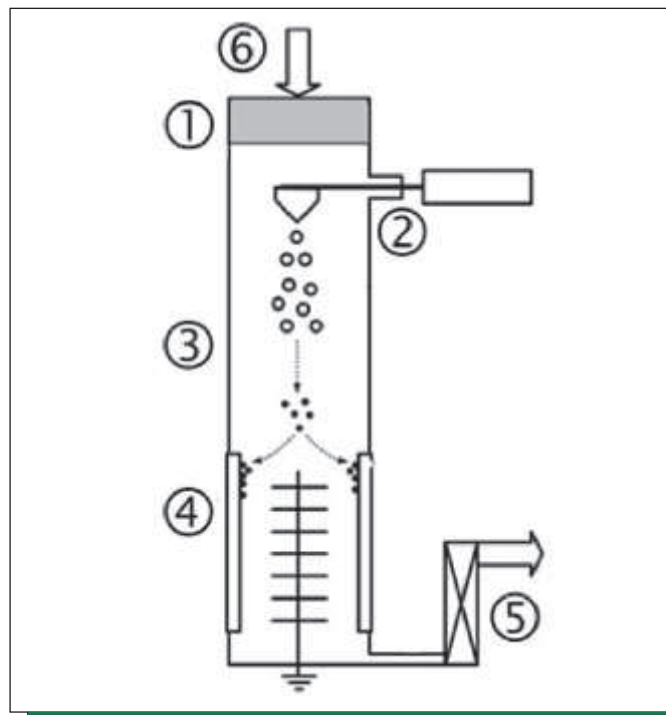


СХЕМА | Принцип работы Buchi Nano Spray Dryer B-90: 1 – нагревание, 2 – формирование капель, 3 – сушильная камера (аэродинамическая труба), 4 – сбор частиц, 5 – выходной фильтр, 6 – осушение газа [26]

того, такие параметры прибора, как температура на входе, температура головки, давление, скорость распыления и т.д., могут влиять на размер и форму микрочастиц.

Также одним из наиболее важных условий, влияющих на размер полимерных микрочастиц, является концентрация полимера в органическом растворителе. Дело в том, что капля с фиксированным размером (этот размер больше, чем диаметр отверстия в мембране) высыхает до окончательного размера, определяемого количеством полимера, содержащемся в ней. Чем меньше вещества содержится в капле, тем меньше размер частиц. Но при увеличении концентрации полимера вязкость и плотность раствора полимера также растут, и наступает момент, когда создание частиц становится невозможным из-за того, что раствор стал слишком вязким и густым. Эмпирически максимальной концентрацией полимера этой молекулярной массы в растворе, при которой возможно электродинамическое высушивание, является 50 мг вещества в 1 мл хлороформа. Именно при такой концентрации застывающая капля в аэродинамической трубе содержит наибольшее количество вещества, а, следовательно, эффективность процесса повышается, но при этом микрочастицы сохраняют достаточно малый размер, достаточный для их попадания внутрь клетки путем эндоцитоза [27].

Включение ПКЛ в микрочастицы определялось с помощью УФ-спектроскопии. Содержание вещества равнялось теоретическому – 12.6 ± 0.7 вес. %.

Другие варьируемые параметры прибора не вносили особого вклада в морфологию микрочастиц, а также на включение паклитаксела в полимерную матрицу. Однако их влияние распространялось на само проведение технологического процесса. Данные по их варьированию приведены в приложении в *табл. 1*. Исходя из нее видно, что оптимальными параметрами для создания микрочастиц ПГБ, загруженных ПКЛ, являются те, которые мы использовали и которые приведены в *табл. 1*.

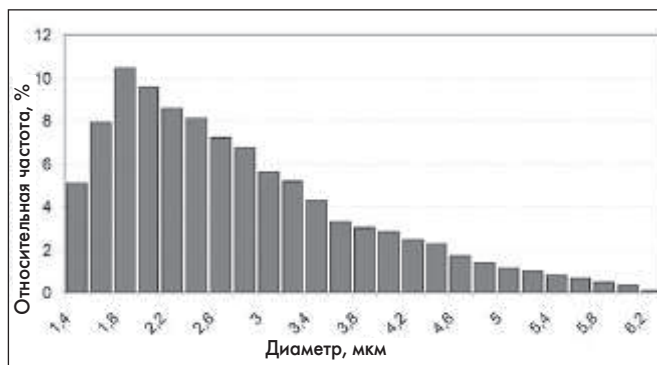


РИСУНОК 3 | Распределение частиц по размерам

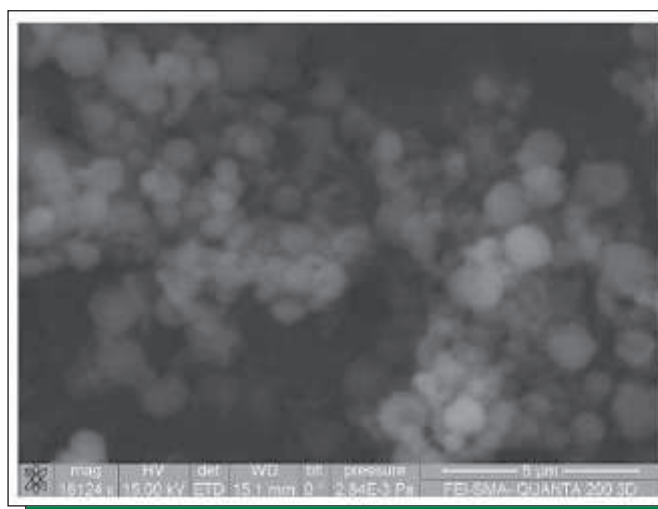


РИСУНОК 4 | СЭМ-изображение наночастиц, изготовленных из ПГБ 6000 Да с инкапсулированным ПКЛ

По данным дифференциальной сканирующей калориметрии кристалличность полимерных микрочастиц составляла 65.0 % при температуре плавления $T_n^{пик}$ от 133.9 до 155.2 °С.

В качестве образца сравнения для микрочастиц, получаемых с помощью высокотехнологичного полупромышленного метода, описанного выше, были выбраны полимерные наночастицы, изготовленные с помощью метода прямого мембранного эмульгирования [28]. Данная методика широко распространена и применялась ранее в нашей лаборатории для получения субмикронных и наночастиц. При этом включение ПКЛ равнялось 10.5 ± 1.2 %. Для определения морфологии наночастиц использовалась сканирующая электронная микроскопия (*рис. 4*). Округлые наночастицы имели диаметр от 50 до 700 нм со средним диаметром 216 нм. Гидродинамический диаметр наночастиц составлял 351 ± 74 , ζ -потенциал –9.43 мВ. Кристалличность полимерных наночастиц составляла 65.0 % при температуре плавления $T_n^{пик}$ от 132.0 до 157.3 °С.

Таким образом, было показано, что микрочастицы, загруженные паклитаксолом, хоть и превышают размерами наночастицы, однако не сильно отличаются по морфологии и поверхностному заряду. Сравнительные характеристики частиц приведены в сводной *табл. 2*. Это позволяет высказать предположение, что метод пьезоэлектрического распыления в инертной атмосфере является хорошим подходом для масштабирования лабораторного метода получения новой лекарственной формы ПКЛ. Однако в дальнейшем безусловно, потребуются сравнить микро- и наночастицы по методу

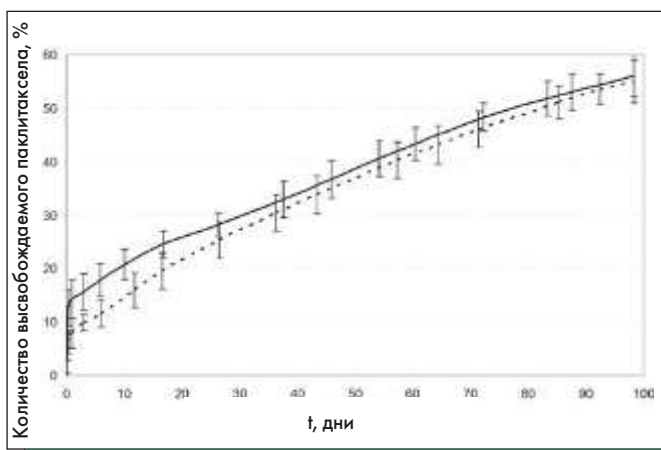


РИСУНОК 5 | Кинетический профиль высвобождения паклитаксела *in vitro* из микрочастиц (черная кривая), полученных методом электродинамического высушивания, и наночастиц (пунктирная линия), полученных методом одностадийного эмульгирования

доставки лекарственного вещества в клетки *in vitro* и *in vivo*, так как хотя средний диаметр микрочастиц находится ниже порогового значения для эндоцитоза клетками [29], они имеют плотную гидратную оболочку, что показано по разнице в диаметре и гидродинамическом диаметре микрочастиц более чем в 2 раза. По физико-термическим параметрам микрочастицы, загруженные ПКЛ, не отличались от соответствующих наночастиц.

••ИЗУЧЕНИЕ ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПАКЛИТАКСЕЛА *IN VITRO*

На следующем этапе работы была исследована кинетика высвобождения лекарственного вещества из ранее полученных микро- и наночастиц, загруженных паклитакселом *in vitro*. Частицы инкубировали в фосфатном буфере с добавлением изотонического раствора хлорида натрия и Твин-80 при перемешивании на шейкере. Из-за большого времени эксперимента в среду добавлялся азид натрия в качестве антибактериального агента.

Полученные данные (рис. 5) демонстрируют довольно низкий уровень начального «взрывного» (burst)-эффекта (быстрого высвобождения ЛВ в первые часы), а линейная часть кинетики высвобождения вещества является доминирующей. Это положительная характеристика для пролонгированного высвобождения паклитаксела, так как это означает, что микрочастицы могут обеспечить длительную противоопухолевую терапию с заданной скоростью. Следует также отметить, что кинетический профиль высвобождения паклитаксела из полимерных наночастиц (рис. 5) по кинетике высвобождения лекарственного препарата не отличался от микрочастиц, полученных с помощью метода пьезоэлектрического спрей-высушивания, что хорошо коррелирует с ранее полученными в нашей лаборатории данными, согласно которым решающим фактором, воздействующим на кинетику высвобождения паклитаксела из частиц, является их состав, а размер частиц оказывает лишь малое воздействие на кинетические профили [30, 31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, с помощью высокотехнологичного метода распылительного высушивания были получены микрочастицы, загруженные паклитакселом. Микрочастицы имеют правильную сферическую форму, хорошо диспергируются в водной среде. Высвобождение вещества из них характеризуется незначительным начальным взрывным высвобождением с дальнейшим пролонгированным выходом паклитаксела, что может быть использовано для длительного поддержания определенной концентрации действующего вещества в динамических водных средах живых тканей и культуральных сред. Эти данные позволяют говорить о разработке новой формы противоопухолевого лекарственного препарата паклитаксела, готовой для дальнейших испытаний *in vitro* и *in vivo*.

Работа была финансово поддержана грантом РФФИ офи-м, проект № 15-29-04856. Оборудование Центров коллективного пользования МГУ (в т.ч. Распылительная сушилка и Комплекс для получения микро- и наночастиц, закупленные в рамках Программы развития МГУ до 2020 года) и ФИЦ ФОБ РАН было использовано в работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gelderblom H., et al. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation // *European J. Cancer*. 2001. V. 37. № 13. P. 1590–1598.
- Whelan J., et al. Targeted taxane therapy for cancer // *Drug Discovery Today*. 2002. V. 7. № 2. P. 90–92.
- Nieuweboer A.J.M., et al. Predicting paclitaxel-induced neutropenia using the DMET platform // *Pharmacogenomics*. 2015. V. 16. № 11. P. 1231–1241.
- Park J., Ye M., Park K. Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs // *Molecules*. 2005. V. 10. № 1. P. 146–161.
- Chung H.J., et al. Heparin immobilized porous PLGA microspheres for angiogenic growth factor delivery // *Pharmaceutical Research*. 2006. V. 23. № 8. P. 1835–1841.
- Jenkins M. *Biomedical polymers*. University of Birmingham press: UK, 2007.
- Shtilman M.I. *Polymeric biomaterials. Part 1. Polymer implants*. VSP: Utrecht-Boston, 2003.
- Bonartsev A.P., et al. Poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2011. V. 5. № 1. P. 10–21.
- Chen G.Q., Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 33. P. 6565–6578.
- Boskhomdzhev A.P., et al. Biodegradation kinetics of poly (3-hydroxybutyrate)-based biopolymer systems // *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2010. V. 4. № 2. P. 177–183.
- Bonartsev A.P., et al. Hydrolytic degradation of poly (3-hydroxybutyrate), polylactide and their derivatives: kinetics, crystallinity, and surface morphology // *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 2012. V. 556. № 1. P. 288–300.
- Myshkina V.L., et al. Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Azotobacter chroococcum* strain 7B // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2010. V. 46. № 3. P. 289–296.
- Bonartsev A.P., et al. Cell attachment on poly (3-hydroxybutyrate)-poly (ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // *BMC Biochemistry*. 2013. V. 14. № 1. P. 1.
- Bonartsev A.P., et al. Controlled release profiles of dipyrindamole from biodegradable microspheres on the base of poly (3-hydroxybutyrate) // *Express Polymer Lett*. 2007. V. 1. № 12. P. 797–803.
- Beck-Broichsitter M., et al. Characterization of novel spray-dried polymeric particles for controlled pulmonary drug delivery // *J. Controlled Release*. 2012. V. 158. № 2. P. 329–335.
- Myshkina V.L., et al. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. T. 44. № 5. C. 482–486.
- Патент РФ № 2001128135/13, 18.10.2001. Бонартцева Г.А., Заргеба Е.Д., Мышкина В.Л., Фурина Е.К. Штамм *Azotobacter chroococcum* — продуцент поли-β-октибутирата // Патент России № 2194759. 2002. Бюл. № 33.
- Yu G., Marchessault R.H. Characterization of low molecular weight poly (β-hydroxybutyrate) s from alkaline and acid hydrolysis // *Polymer*. 2000. V. 41. № 3. P. 1087–1098.
- Nano Spray Dryer B-90 Application Booklet, Application note for PLA (Polylactic acid) R 202 H, Order no. 092243 / en / July 09.
- Бонартцев А.П. и др. Пролонгированное высвобождение противоопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата // *Биомедицинская химия*. 2011. T. 57. № 2. С. 232–240.

21. Zheng Z., et al. Effects of crystallization of polyhydroxyalkanoate blend on surface physicochemical properties and interactions with rabbit articular cartilage chondrocytes // *Biomaterials*. 2005. V. 26. № 17. P. 3537–3548.
22. Barham P.J., et al. Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate // *J. Materials Science*. 1984. V. 19. № 9. P. 2781–2794.
23. Asrar J., et al. Biosynthesis and properties of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers // *Biomacromolecules*. 2002. V. 3. № 5. P. 1006–1012.
24. Бонарцев А.П. и др. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе // *Биомедицинская химия*. 2011. Т. 57. № 4. С. 374–391.
25. Bagrov D.V., et al. Amorphous and semicrystalline phases in ultrathin films of poly (3-hydroxybutyrate) // *TechConnect World NTSI-Nanotech 2012 Proceedings*. 2012. P. 602–605.
26. Nano Spray Dryer B-90. Technical data sheet.
27. Li X., et al. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90 // *J. Controlled Release*. 2010. V. 147. № 2. P. 304–310.
28. Vladislavjevic G.T., Williams R.A. Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes // *Adv. Colloid. Interface Sci*. 2005. V. 113. № 1. P. 1–20.
29. Kolhar P., Mitragotri S. Polymer microparticles exhibit size and shape dependent accumulation around the nucleus after endocytosis // *Advanced Functional Materials*. 2012. V. 22. № 18. P. 3759–3764.
30. Bonartsev A.P., et al. Sustained release of the antitumor drug paclitaxel from poly (3-hydroxybutyrate)-based microspheres // *Biochemistry (Moscow). Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. 2012. V. 6. № 1. P. 42–47.
31. Яковлев С.Г. Лекарственные системы на основе микро- и наночастиц из полиоксибутирата, его сополимеров и композитов: Дис... канд. биол. наук: 03.01.06: защищена 08.10.2013. М., 2013. С. 113–123, 133–137.