

БИОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ АЛИФАТИЧЕСКИХ СЛОЖНЫХ ПОЛИЭФИРОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ

Коржиков В.А., Сеницына Е.С., Собинина Ю.М., Тенникова Т.Б.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетский пр., 26, г. Санкт-Петербург, 199004, РФ

e-mail: v_korzhikov@mail.ru

Аннотация. В работе описаны основные принципы создания полимерных микро- и наночастиц для доставки как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных лекарственных препаратов внутрь организма. Для получения микро- и наночастиц использованы методы одинарной эмульсии и наноосаждения, соответственно. Для инкапсулирования гидрофобных препаратов использован метод одинарной эмульсии, а для включения гидрофильных препаратов и белков – метод двойной эмульсии. Кроме того, в работе приводятся результаты биологических испытаний полученных полимерных частиц для терапии туберкулеза.

Ключевые слова: биodeградируемые частицы, системы доставки лекарств.

BIOFUNCTIONAL ALIPHATIC POLYESTER-BASED PARTICLES – PERSPECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEMS

Korzhikov V.A., Sinitsyna E.S., Sobinina Yu.M., Tennikova T.B.

St. Petersburg State University

Universitetskii pr., 26, St. Petersburg, 199004, Russia

e-mail: v_korzhikov@mail.ru

Abstract. The paper describes the basic principles as applied to create polymeric micro- and nanoparticles to deliver both low molecular weight and high molecular weight drugs into the body. For micro- and nanoparticles obtaining the methods of single emulsion and nanoprecipitation were used, respectively. We used single emulsion method to encapsulate hydrophobic drugs the, and double emulsion method to include hydrophilic molecules and proteins. Furthermore, results of biological tests of the obtained polymer particles for therapy of tuberculosis are presented.

Key words: biodegradable particles, drug delivery systems.

В настоящее время получение частиц на основе биodeградируемых полимеров для инкапсулирования лекарственных веществ (ЛВ) с последующим их контролируемым высвобождением в целевой ткани является одной из перспективных областей, привлекающих большое внимание исследователей во всем мире [1]. Достигающееся при этом пролонгированное высвобождение лекарственного вещества в организме пациента позволяет снизить отрицательное влияние побочных явлений с сохранением желаемого терапевтического эффекта, что особенно важно при использовании ряда сильнодействующих препаратов, таких как стероиды, гормоны, противораковые препараты, антибиотики [2]. Процесс выделения препарата в органе/ткани мишени обеспечивается как диффузией вещества из полимерной оболочки, так и биodeградацией полимерной капсулы [3]. При этом адресная доставка частиц должна достигаться за счет наличия на их поверхности специальных биологических молекул, называемых «векторами».

В качестве основы для создания подобных частиц перспективно использование поли(молочной кислоты) (ПМК), поли(молочной-со-гликолевой кислоты) (ПМГК), которые широко используются в медицине и биотехнологии, являясь биodeградируемыми, нетоксичными и биосовместимыми полимерами [4, 5]. Данные полимеры с успехом синтезируются в нашей лаборатории из соответствующих лактидов путем полимеризации с раскрытием цикла. Кроме того, достаточно перспективными кандидатами для получения биodeградируемых частиц являются поли(капролактон) (ПКЛ) и поли(пентадекалактон) (ППДЛ), синтезируемые ферментативно. Конечными продуктами гидролитической деградации этих полимеров *in vivo* или *in vitro* являются естественные метаболиты, которые утилизируются в человеческом организме в соответствии с биохимическими циклами [5].

В данной работе нами описаны основные принципы создания полимерных микро- и наночастиц для доставки как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных лекарственных препаратов внутрь организма, а также продемонстрирован биологический эффект от использования подобных частиц.

Получение частиц на основе алифатических сложных полиэфиров. Получение сферических частиц на основе синтезированных полимеров проводили с использованием методов одинарной или двойной эмульсии (см. рис. 1), а также наноосаждения. В основе первых двух методов лежит эмульгирование раствора полимера в органическом растворителе (масляная фаза) в водном растворе ПАВ (водная фаза) с последующим испарением масляной фазы и образованием суспензии сферических частиц.

Морфологию полученных частиц оценивали с использованием электронной микроскопии. Полученные микрофотографии представлены на рисунке 2.

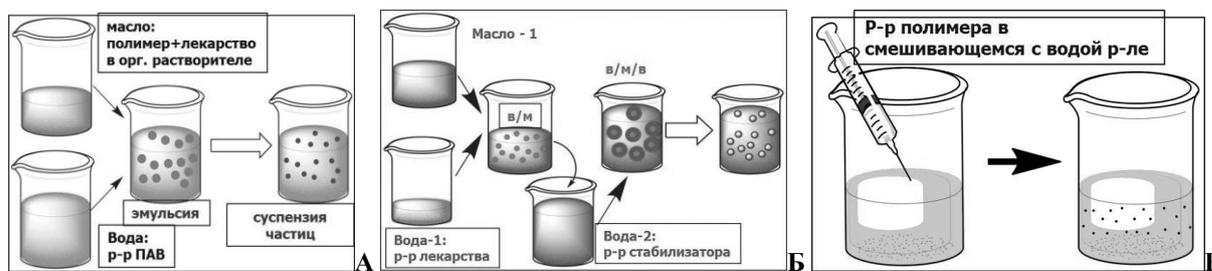


Рисунок 1 – Схема получения частиц методами одинарной (А) и двойной эмульсии (Б), а также наносаждения (В)

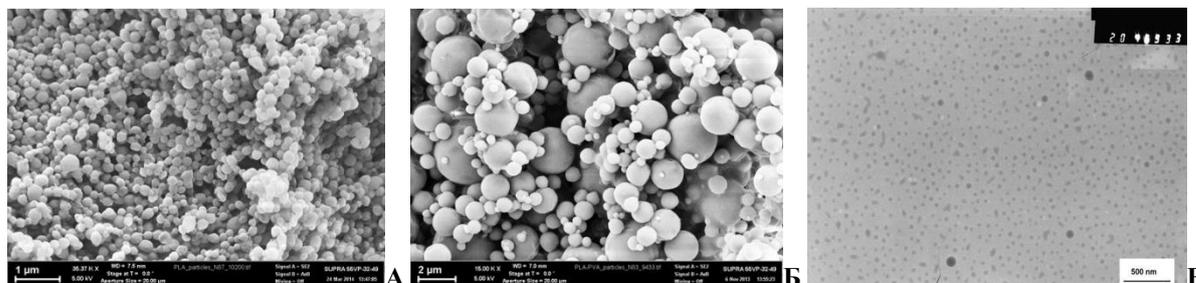


Рисунок 2 – Микрофотографии образцов частиц на основе ПМК, полученных методами одинарной эмульсии (А, СЭМ), двойной эмульсии (Б, СЭМ) и наносаждения (В, ПЭМ)

Изучение полимерных наночастиц, полученных методом одинарной эмульсии в оптимизированных условиях, с использованием динамического рассеяния света (ДРС) показало, что все образцы обладают средним размером менее 1 мкм и имеют унимодальное распределение по размерам (см. рис. 3). Тем не менее, величины среднего диаметра и их дисперсии отличаются для различных полимеров. В то время как на основе ПМГК и ПМК были получены частицы с наименьшим размером и распределением по размерам, данные параметры отличаются для ПКЛ и ППДЛ. По-видимому, увеличение гидрофобности полимера приводит к увеличению вязкости раствора внутри капель эмульсии, что способствует более высокому сопротивлению по отношению к напряжению сдвига, создаваемому при перемешивании. Кроме того, использование достаточно гидрофобных полимеров увеличивает агрегативную неустойчивость образующихся частиц.

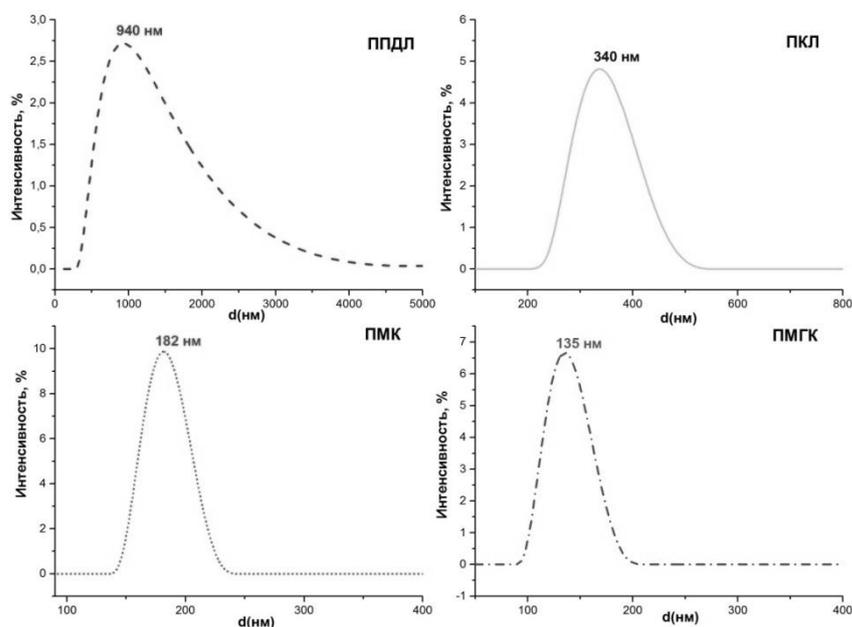


Рисунок 3 – Кривые распределения по размерам для частиц, полученных на основе различных ПГК, измеренные с помощью метода динамического рассеяния света

Распределение частиц, полученных методом наносаждения, по размерам было также изучено методом ДРС (см. рис. 4). Для всех полимеров был получен схожий результат.

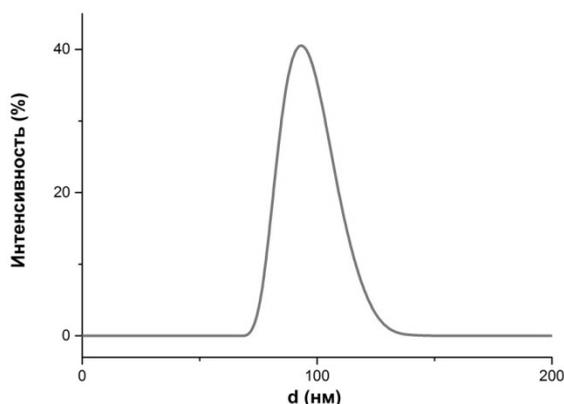


Рисунок 4 - Диаграмма распределения размеров наночастиц на основе ПМК, осажденных из ацетонитрила в воду

Инкапсулирование лекарственных препаратов. На примере получения частиц на основе ПМК было проведено изучения влияния концентрации полимера в органической фазе, а также соотношения водной и органической фаз на размер частиц и эффективность инкапсулирования модельного гидрофобного лекарственного препарата – рисперидона. Эффективность инкапсулирования препарата была рассчитана по следующей формуле:

$$ЭИ(\%) = \frac{M_{нч}}{M_{исх}} \times 100, \quad (1)$$

где $M_{нч}$ – количество препарата (мг) в расчете на 1 мг частиц, а $M_{исх}$ – исходное количество препарата, взятое для инкапсулирования, отнесенное к количеству исходно взятого полимера.

Было показано, что увеличение концентрации полимера приводит как к увеличению размера частиц, так и росту эффективности инкапсулирования препарата (см. табл. 1). Тем не менее, при более высоких концентрациях полимера (8 и 10 масс %), как правило, наблюдается осаждение полимера в виде волокон и пленок, что снижает выход частиц. При концентрации 5 масс% осаждения полимера не наблюдается. По этой причине именно эта концентрация была использована в дальнейших экспериментах. Изучение влияния соотношения фаз на диаметр частиц и ЭИ показало, что увеличение избытка водной фазы от 10 до 20 приводит к значительному снижению размера частиц. Тем не менее, дальнейший рост объема водной фазы не приводит к значительному падению размеров. Данный параметр не оказывал значительного влияния на ЭИ, которая, по всей видимости, зависит в основном от концентрации полимера.

С целью получения частиц меньшего размера и увеличения ЭИ была проведена модификация процесса одинарной эмульсии путем добавления в органическую фазу растворителя (аcetона), который растворяет полимер, но при этом эффективно смешивается с водой. Данный прием позволяет значительно уменьшить размер капель после смешения фаз за счет диффузии аcetона в водную фазу, но при этом сохраняет структуру эмульсии за счет наличие несмешивающегося растворителя, который удаляется путем испарения. Использование этого метода («диффузии-испарения растворителя») позволило значительно уменьшить размер получаемых частиц при сохранении высокой ЭИ.

Таблица 1 – Влияние экспериментальных параметров процесса получения частиц методом одинарной эмульсии на размер частиц и эффективность инкапсулирования рисперидона. *Условия:* водная фаза – ДСН - 0.4 масс%, ПВС - 1 масс%; $T_{\text{эмульгирования}} = 0 \pm 5$ °С ультразвук + перемешивание при 1000 об/мин в течение 5 мин; удаление органического растворителя при 350-100 мБар

| Концентрация ПМК, масс% | Соотношение органической и водной фаз, об/об | D (DPC), нм | ЭИ, % |
|-------------------------|--|-------------|-------|
| 2 | CHCl ₃ /water - 10/1 | 487 | 31±2 |
| 5 | CHCl ₃ /water - 10/1 | 538 | 51±3 |
| 8 | CHCl ₃ /water - 10/1 | 675 | 65±4 |
| 10 | CHCl ₃ /water - 10/1 | 904 | 82±4 |
| 5 | CHCl ₃ /water - 20/1 | 425 | 57±3 |
| 5 | CHCl ₃ /water - 30/1 | 431 | 59±3 |
| 5 | CHCl ₃ /acetone /water – 13/7/1 | 182 | 61±3 |

Изучение ЭИ модельного белка, в частицы получаемые методом двойной эмульсии показало, что на данный параметр сильно влияет природа полимера, а также добавка необходимого стабилизатора (см. рис. 5).

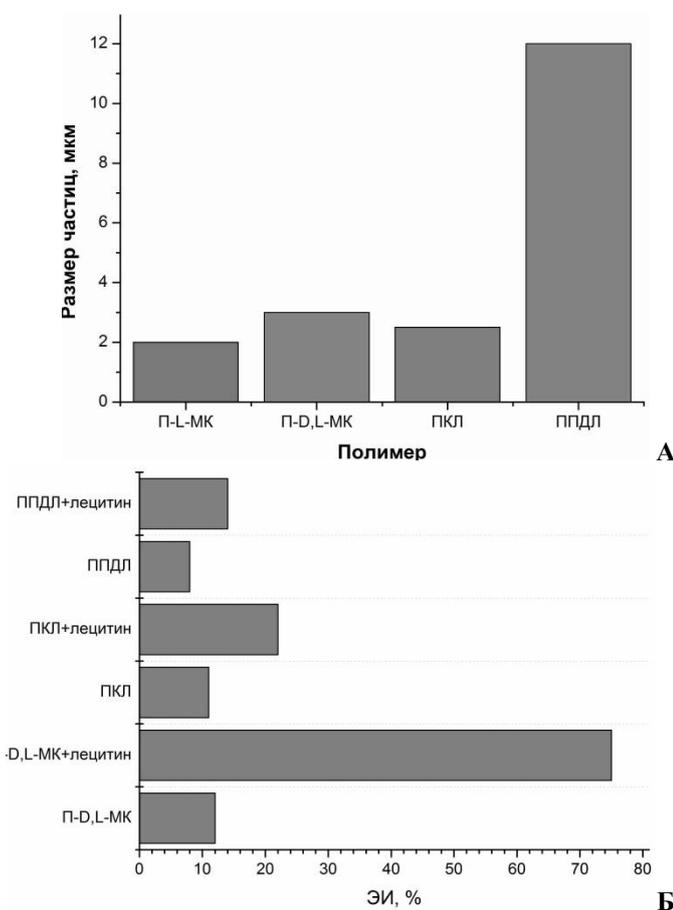


Рисунок 5 – Влияние типа используемого полимера (А) и добавления лецитина (Б) на ЭИ

Влияние инкапсулированного в частицы перхлозона на выживаемость мышей. С целью терапии туберкулеза, частицы на основе ПМК были нагружены противотуберкулезным препаратом – перхлозоном®. После внутрибрюшинного введения частиц с препаратом, они поглощались макрофагами и оказывались в пораженных воспалением лёгких. В этом случае удалось добиться почти 50%-го роста выживаемости животных (см. рис. 6).

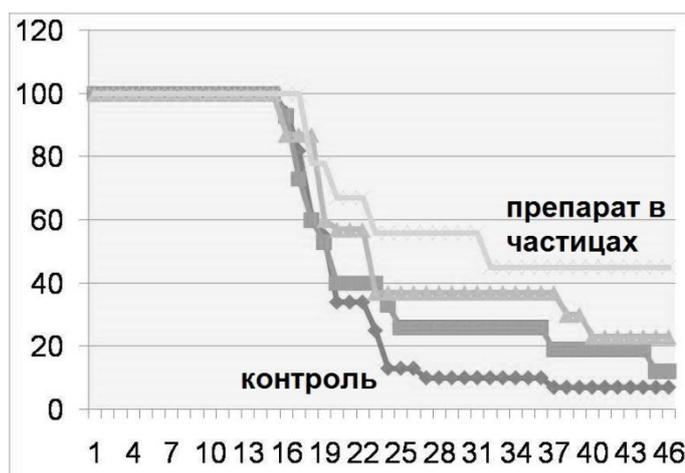


Рисунок 6 – Кривые выживаемости мышинной модели туберкулеза (ось абсцисс – дни, ось ординат – проценты). Кривые снизу вверх: без терапии, перхлозон перорально, свободные частицы внутрибрюшинно, перхлозон в частицах

Таким образом, использование частиц позволило изменить фармакодинамику препарата и увеличить перспективность используемого препарата для терапии туберкулеза.

Работа была выполнена при поддержке РФФ (проект №14-50-00069, направление 05-109).

Список литературы / References:

1. Lassalle V., Ferreira M.L. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. *Macromol. Biosci.*, 2007, vol. 7, pp. 767-783.
2. Praetorius N.P., Mandal T.K. Engineered nanoparticles in cancer therapy. *Recent patents on drug delivery & formulations*, 2007, vol. 1, pp. 37-51.
3. Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B; Biointerfaces*, 2010, vol. 75, pp. 1-18.
4. Hakkarainen M. Aliphatic Polyesters: Abiotic and Biotic Degradation and Degradation Products. *Advances in polymer science*, 2002, vol. 157, pp. 113-134.
5. Makadia H.K., Siegel S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 2011, vol. 3, pp. 1377-1397.

ЭКСПРЕССИЯ С-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКА Е ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА И ИХ ИММУНОГЕННОСТЬ В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ ТИ-КОМПЛЕКСОВ

Иванов А.А.¹, Кондратов И.Г.², Люкманова Е.Н.³, Веремейчик Г.Н.⁴,
Мазейка А.Н.¹, Цыбульский А.В.¹, Костецкий Э.Я.¹, Санина Н.М.¹

¹Дальневосточный федеральный университет
ул. Суханова, 8, г. Владивосток, 690950, РФ
e-mail: sentado_333@mail.ru

²Лимнологический институт СО РАН
ул. Улан-Баторская, 3, г. Иркутск, 664033, РФ

³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997, РФ

⁴Биолого-почвенный институт ДВО РАН
пр. 100-летия Владивостоку, 159, г. Владивосток, 690022, РФ

Аннотация. С целью создания субъединичной вакцины против распространенного и смертельно опасного вирусного заболевания - клещевого энцефалита наиболее целесообразным представляется использование III домена белка E вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), включающего основные эпитопы нейтрализации вируса, и прилегающей к нему С-концевой цепочки белка E, состоящей из ножки и гидрофобного якоря, необходимого для инкорпорирования белка в созданный нами адьювантный наноноситель антигенов - тубулярный иммуностимулирующий комплекс (ТИ-комплекс). Для получения двух фрагментов белка E: III домена и III домена с ножкой и гидрофобным якорем была использована экспрессионная система *Escherichia coli* и бесклеточная система. Показано, что гидрофобный якорь, токсичный для бактерии, разрушается после синтеза в клетке. Однако в бесклеточной среде фрагмент белка E с гидрофобным якорем был успешно экспрессирован. Иммунизация мышей полученными антигенами как в составе ТИ-комплексов, так и без них показала отсутствие иммуногенности III домена, тогда как III домен с ножкой и гидрофобным якорем в 2 раза эффективнее стимулировал выработку антител по сравнению с контролем. Инкорпорирование этого рекомбинантного белка в ТИ-комплексы приводило к дальнейшему повышению иммуногенности антигена в 1.5 раза. Полученные результаты будут использованы для поиска более эффективных форм С-концевого домена белка E для получения оптимальной вакцинной конструкции на основе ТИ-комплексов.

Ключевые слова: экспрессионные системы, субъединичные белки, адьювантный наноноситель антигена.

EXPRESSION OF C-TERMINAL FRAGMENTS OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS E PROTEIN AND ITS IMMUNOGENICITY IN THE CONTENT OF NANOPARTICULATE TI-COMPLEX

Ivanov A.A.¹, Kondratov I.G.², Lukmanova E.N.³, Veremeichik G.N.⁴,
Mazeika A.N.¹, Tsybulsky A.V.¹, Kostetsky E.Y.¹, Sanina N.M.¹

¹Far Eastern Federal University
Sukhanov str., 8, Vladivostok, 690950, Russia
e-mail: sentado_333@mail.ru

²Limnological Institute SB RAS
Ulan-Batorskaya str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

³Institute of bioorganic chemistry RAS
Miklukho-Maklaya str., 16/10, Moscow, 117997, Russia

⁴Institute of Biology and Soil Science FEB RAS
100 let Vladivostoku av., 159, Vladivostok, 690022, Russia

Abstract. In order to create subunit vaccine against widespread and deadly viral disease - encephalitis, most feasible is the use of domain III of the tick-borne encephalitis virus (TBE) E protein, which includes the main virus neutralizing epitopes, as well as the adjacent C-terminal polypeptide chain, consisting of the stem and a hydrophobic anchor required for incorporation of the protein into the adjuvant nanocarrier of antigens – tubular immunostimulating complex (TI-complex) elaborated by us. It was used expression system of *Escherichia coli* and the cell-free expression