ХИМИЧЕСКАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

УДК 547-313+54.057:66.017:53.06

ПОЛУЧЕНИЕ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЯ КАПСУЛ ИЗ БИОСОВМЕСТИМОГО СОПОЛИМЕРА ЛАКТИДА И ГЛИКОЛИДА С ВКЛЮЧЕНИЕМ ИНТЕРФЕРОНА

И. А. Хлусов^{1,2,3,4,*}, Э. В. Киблер², В. Л. Кудрявцева², С. И. Твердохлебов², Е. Н. Больбасов², В. В. Ботвин¹, А. Д. Латыпов¹, Н. Д. Газатова⁴, Л. С. Литвинова⁴, академик РАН В. М. Бузник¹, академик РАН Е. Л. Чойнзонов^{2,5}

Поступило 12.09.2018 г.

Впервые применили метод электрораспыления для получения полимерных капсул из биорезорбируемого сополимера *dl*-лактида и гликолида, содержащих биологические молекулы из состава клеточного секретома и, в частности, интерферон альфа 2b (ИФН α-2b) человека. Полученные близкие к сферическим субмикронные капсулы исследовали методами сканирующей электронной и конфокальной лазерной микроскопии. Капсулы сохраняли структурную целостность и цитотоксическую активность ИФН α-2b в отношении опухолевых клеток. Метод электрораспыления отличается высокой технологичностью, экологической безопасностью, позволяет производить широкий спектр материалов разного состава и морфологии, перспективных для адресной доставки лекарственных препаратов и биологических молекул.

Ключевые слова: PLGA-микрокапсулы, рекомбинантный интерферон-α человека, сканирующая электронная микроскопия, конфокальная сканирующая лазерная микроскопия, биодеградация in vitro, цитотоксичность.

DOI: https://doi.org/10.31857/S0869-56524846703-708

В настоящие время разработка инкапсулированных систем адресной доставки (ИСАД) лекарственных средств и биологических молекул в организме является прогрессивным направлением, во многом определяющим уровень развития современной регенеративной медицины, тканевой инженерии и противоопухолевой терапии. Сополимер лактида и гликолида (PLGA) является одним из наиболее перспективных биорезорбируемых полимеров для изготовления ИСАД в форме субмикронных полимерных капсул [1]. Для создания субмикронных капсул PLGA, содержащих лекарственные препараты, применяются методы одинарной или двойной эмульсии, распылительная сушка, метод послойного осаждения, которые имеют свои недостатки (высокие температуры, сложность подбора состава эмульсий, высокое значение поверхностного напряжения на границе раздела поверхностей растворов, необходимость использования заряжённых частиц) [2]. Метод электрораспыления позволяет формировать капсулы при низких температурах, контролировать их размер и форму при относительно простом аппаратном обеспечении технологического процесса [3].

Препараты интерферонов (альфа, бета, гамма) человека успешно используются преимущественно при опухолевых и вирусных заболеваниях. Однако вследствие быстрого их выведения из организма требуется длительное применение высоких доз интерферонов [4], часто приводящих к серьёзным системным осложнениям, включая остеопороз [5]. Иммобилизация интерферона в полимерные биодеградируемые матрицы и субмикронные капсулы предполагает пролонгированное контролируемое высвобождение при его парентеральном введении [6] или внутриклеточной доставке [7]. В доступной литературе мы не обнаружили информацию об инкапсулировании интерферонов при помощи метода электрораспыления, что уменьшает потенциальное разнообразие ИСАД для клинической практики.

¹Национальный исследовательский

Томский государственный университет

² Национальный исследовательский

Томский политехнический университет

³Сибирский государственный медицинский

университет, Томск

⁴ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград

⁵ Томский национальный исследовательский

медицинский центр Российской Академии наук

^{*}E-mail: khlusov63@mail.ru

Целью настоящей работы было получение методом электрораспыления субмикронных PLGA-капсул, в том числе с включением интерферона человека, исследование возможности высвобождения и биологической (противоопухолевой) активности препарата после инкапсулирования.

Сополимер молочной и гликолиевой кислоты (PLGA) получали методом ионно-координационной полимеризации с раскрытием циклов *dl*-лактида и гликолида [8, 9] в присутствии октоата олова ("Sigma-Aldrich", США) и лаурилового спирта ("Sigma-Aldrich") в качестве катализатора и сокатализатора соответственно при температуре 170 °С в течение 6 ч.

Молекулярную массу синтезированного PLGA определяли методом гельпроникающей хроматографии (хроматограф Agilent 1200, "Agilent Technology", США), соотношение лактидных мономерных звеньев в полимере (Л) — методом ЯМР ¹Н-спектроскопии (Bruker AVANCE 400 III HD, "Bruker Corp.", США). Соотношение мономерных звеньев в сополимере рассчитывали по формуле (в %)

$$ω(Π) = \frac{I_{\rm CH}}{I_{\rm CH} + I_{\rm CH_2}/2} \cdot 100$$

где $I_{\rm CH}$ — интегральная интенсивность ЯМР-сигнала протонов CH-групп в спектре (5,22 ± 0,05 ppm), $I_{\rm CH_2}$ — интегральная интенсивность сигнала от CH₂групп в спектре (4,85 ± 0,05 ppm).

Остаточное содержание мономеров определяли методом газовой хроматографии (хроматограф Хроматэк Кристалл 5000, ЗАО СКБ "Хроматэк", Россия), содержание олова — методом атомно-эмиссионной спектроскопии с микроволновой плазмой (Agilent 4100, "Agilent Technology").

Для изготовления полимерных капсул приготовили прядильные растворы четырёх типов: первый (контрольный) — 5%-й раствор PLGA M_r ~ ~ 50000 г/моль в ацетонитриле (CH₃CN, НПО "Реактивы ОСЧ", Россия); второй — 5%-й раствор PLGA в CH₃CN, содержащий интерферон альфа-2b $(И\Phi H \alpha - 2b)$ в концентрации 0,1 · 10⁶ ME/г; третий — 5%-й раствор PLGA в CH₃CN с 0,5 · 10⁶ ME/г ИФН α-2b; четвёртый — 5%-й раствор PLGA в CH₃CN с концентрацией $1 \cdot 10^6$ ME/г ИФН α -2b. Прядильные растворы готовили в герметичных стеклянных реакторах при температуре $6 \pm 2 \, ^{\circ}\mathrm{C}$ до получения однородных прозрачных растворов. В качестве источника ИФН α-2b использовали препарат для инъекций Реаферон-ЕС (ЗАО "Вектор-Медика", Россия, 5 · 10⁶ МЕ активности в 17 мг сухого вещества).

Полимерные капсулы формировали с помощью установки электрораспыления NANON-NF 101 ("MECC Co.", Япония) при температуре 6 ± 2 °C. Для изготовления контрольных капсул использовали капилляр 27G, объёмный расход прядильного раствора 0,50 ± 0,05 мл/ч, напряжение 20 ± 3 кВ, расстояние от капилляра до сборочного коллектора 55 ± 5 мм. При изготовлении капсул с ИФН α -2b применяли напряжение 25 ± 3 кВ.

Морфологию капсул изучали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) с помощью микроскопа Vega 3 ("Tescan", Чехия), используя нанесение на капсулы золотого напыления магнетронной распылительной системой SC7640 ("Quorum Technologies Ltd", Великобритания). Посредством программного обеспечения ImageJ 1.38 измеряли большой (d_{max}) и малый (d_{min}) диаметры капсул на 10 цифровых изображениях при увеличении 2000×. Согласно рекомендациям стандарта ASTM F1877–16 вычисляли индекс овальности *AR* (Aspect Ratio) и показатель округлости *R* (Roundness), используя формулы

$$AR = \frac{d_{\max}}{d_{\min}}, \quad R = \frac{4A}{\pi d_{\max}^2},$$

где *А* — площадь частицы на микрофотографии СЭМ.

Оценку эффективности загрузки ИФН α -2b в капсулы с PLGA проводили методом флуоресцентной спектроскопии (лазерный сканирующий конфокальный микроскоп ZEISS LSM 780 NLO, "Carl Zeiss", Германия) при облучении образцов монохроматическим излучением с длиной волны 488 нм. На ИФН α -2b наносили метку изотиоцианата флуоресцеина (Fluorescein isothiocyanate, FITC, "Sigma-Aldrich") согласно протоколу [10]. Измеряли среднюю интегральную интенсивность флуоресценции образцов в диапазоне 400–450 нм ($I_{400-450}$) и 470– 520 нм ($I_{470-520}$) в 10 полях зрения размером 140 × 140 мкм.

Высвобождение ИФН α -2b из капсул с PLGA оценивали после их растворения в течение 3 сут при 37 °C в бесклеточной питательной среде RPMI 1640 (Gibco[®], "ThermoFisher Scientific", США), ранее использованной для культивирования Т-лимфобластоподобных клеток человека линии Jurkat 5332 (Институт цитологии РАН, Россия). Иммуноферментный анализ проводили, используя набор Альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ ("Вектор Бест", Россия) согласно протоколу производителя тест-системы на автоматическом анализаторе Lazurit ("Dynex Technologies Inc.", США).

Краткосрочность исследования биодеградации скапсул с PLGA была обусловлена высокой пролиферативной активностью опухолевых Т-клеток и Jurkat, через 3 сут требующих полной замены питательной среды. В предварительном трёхсуточном н эксперименте мы установили, что Т-клетки Jurkat с чувствительны к цитотоксическому действию (ИФН α-2b в прямой зависимости от концентрации и препарата Реаферон-ЕС (0,05; 0,25; 0,5 и 1,0 млн

r = -0.92; p = 0.00003; n = 12).Т-клетки Jurkat ($0.6 \cdot 10^6$ жизнеспособных клеток) культивировали 3 сут с PLGA-капсулами ($1 \cdot 10^6$ ME ИФН α -2b на 1 г сополимера или без ИФН α -2b) в концентрациях 0,75; 1,5; 3 мг/мл в 90% RPMI 1640 и 10% инактивированной (56 °C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров ("Sigma-Aldrich"). Подсчёт концентрации и жизнеспособности клеток при окраске 0,4% трипанового синего ("Invitrogen", США) осуществляли с помощью CountessTM Automated Cell Counter ("Invitrogen").

ME/мл; уравнение регрессии y = 4,79-4,97x;

Для оценки статистической значимости различий применяли критерий UВилкоксона—Манна—Уитни. Связь между исследуемыми показателями устанавливали методом регрессионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $p \le 0.05$.

Согласно гельпроникающей хроматографии среднемассовая молекулярная масса синтезированного PLGA составила $50\,000 \pm 5000$ г/моль, степень полидисперсности 2,4. Синтезированный сополимер PLGA содержал $53 \pm 2\%$ звеньев *dl*-лактида и $47 \pm 2\%$ звеньев гликолида. Остаточное содержание мономеров и олова составило $2 \pm 1\%$ и 100 ± 20 ppm соответственно. Согласно СЭМ полимерных капсул без ИФН α-2b (рис. 1а) и капсул, загруженных ИФН α -2b (рис. 1б-г), они имели гладкую поверхность, близкую к сферической, что могло быть обусловлено высокой (более 4 мас.%) концентрацией PLGA в прядильном растворе [11]. В табл. 1 представлены средние значения большого и малого диаметров тестируемых PLGA капсул, а также средние значения индексов AR и R.

Увеличение в прядильном растворе концентрации/активности ИФН α -2b в пределах 0,1–1,0 × × 10⁶ МЕ/г сополимера достоверно не влияло на линейный размер и морфологию субмикронных капсул (рис. 1, табл. 1). Геометрическая форма частиц представляла собой невыраженный эллипс (индекс овальности *AR* на 11–26% превышал единицу) с ровными краями.

Исследование эффективности загрузки ИФН α-2b в полимерные капсулы показало наличие их собственной флуоресценции, флуоресценции FITCмеченого ИФН α -2b в составе микрокапсул и FITC-меченого ИФН α -2b без инкапсуляции. При возбуждении монохроматическим излучением с длиной волны λ = 488 нм PLGA-микрокапсулы без ИФН α -2b флуоресцировали в диапазонах 400–450 нм (с максимумом интенсивности при λ = 420 нм) и 470–520 нм (максимум при λ = 483 нм). В этих условиях максимум интенсивности капсул с PLGA перекрывался максимумом интенсивности флюоресценции FITC при λ = 488 нм.

Для предварительной оценки эффективности инкорпорирования ИФН α -2b в микрокапсулы с PLGA мы использовали отношение интенсивности флуоресценции в диапазоне 470–520 нм ($I_{470-520}$) к таковой в диапазоне 400–450 нм ($I_{400-450}$). Введение меченного FITC ИФН α -2b в прядильный раствор в концентрациях 0,1; 0,5; и 1,0 млн МЕ/г сополимера сопровождалось увеличением отношения $I_{470-520}/I_{400-450}$ соответственно на 23, 157 и 249% по сравнению с образцом микрокапсул без ИФН α -2b (табл. 2). Таким образом, увеличение концентрации ИФН α -2b в прядильном растворе сопровождалось ростом концентрации ИФН α -2b в микрокапсулах с PLGA.

Известно всего несколько работ (например, [12, 13]), посвящённых исследованию стабильности и биологической активности ИФН α-2b, иммобилизированного в капсулы с PLGA методом двойной эмульсии с последующим выпариванием растворителя. В нашей работе иммуноферментный анализ экстрактов после трёхсуточной деградации in vitro микрокапсул с PLGA в упомянутых трёх концентрациях, полученных электрораспылением с ИФН α -2b в концентрации 1 · 10⁶ ME/г сополимера, выявил линейное (*y* = 21,7 + 1,61*x*; *r* = 0,81; *p* = 0,00001; n = 21) увеличение высвобождения белка в раствор в диапазоне 23-27 пг/мл (табл. 3). Микрокапсулы PLGA-ИФН α-2b в концентрации 0,75 мг/мл оказывали антипролиферативное действие на Т-клетки Jurkat. Дальнейшее увеличение концентрации микрокапсул с PLGA, но без ИФН α-2b до 1,5-3 мг/мл способствовало их собственному цитотоксическому действию, маскирующему влияние интерферона. Тем не менее данные работы [14] позволяют предположить, что полученные микрокапсулы в дозах, вызывающих гибель чувствительных опухолевых клеток in vitro, будут нетоксичны для животных и человека при парентеральном назначении.

Таким образом, мы впервые использовали метод электрораспыления для получения близких к сферическим частиц субмикронных размеров, содержащих



Puc. 1. Изображения СЭМ микрокапсул с PLGA, сформированных методом электрораспыления. a — контроль, $6 - 0.1 \cdot 10^6$ ME ИΦH α-2b/г PLGA, $B - 0.5 \cdot 10^6$ ME ИΦH α-2b/г PLGA, $r - 1.0 \cdot 10^6$ ME ИΦH α-2b/г PLGA.

PLGA и нагруженных ИФН α-2b, с сохранением их структурной целостности и биологической активности. Подобрали режим электрораспыления, обеспечивающий стабильность процесса и позволяющий

контролировать морфологию и размеры микрокапсул. Включение компонентов клеточного секретома (на примере интерферона) может быть полезным при производстве ИСАД для регенеративной медицины.

Капсулы с разной активностью белка, $\times 10^6$ ME/г PLGA	Большой диаметр капсул, мкм	Малый диаметр капсул, мкм	AR	R
0	$0,\!79\pm0,\!15$	0,64±0,14	$1,24 \pm 0,25$	$0,88\pm0,51$
0,1	$0,74\pm0,19$	$0,67{\pm}0,15$	$1,11 \pm 0,31$	$0,83\pm0,67$
0,5	$0,93\pm0,23$	$0,74{\pm}0,19$	$1,26 \pm 0,37$	$0,63\pm0,41$
1,0	$0,73\pm0,17$	$0,62{\pm}0,10$	$1,18\pm0,26$	$0,84\pm0,50$

Таблица 1. Морфометрические характеристики PLGA-микрокапсул, содержащих ИФН α -2b

Примечание. Здесь и в табл. 2 $M \pm m$, n = 10.

Содержание FITC-	Включение FITC-меченого ИФН α-2b в капсулы по интенсивности флуоресценции				
меченого ИФН α-2b в прядильном растворе, ME на грамм PLGA	Интенсивность флуоресценции, I ₄₀₀₋₄₅₀ , отн. ед.	Интенсивность флуоресценции, $I_{470-520}$, отн. ед.	$I_{470-520}/I_{400-450}$		
0	202 ± 37	356 ± 49	$1,76\pm0,56$		
$0,1 \cdot 10^{6}$	193 ± 28	418 ± 37	$2,16 \pm 0,51$		
$0,5 \cdot 10^{6}$	211 ± 23	558 ± 48	$2,\!64\pm0,\!52$		
$1,0 \cdot 10^{6}$	217 ± 53	885 ± 107	$4,07\pm1,49$		
Исходный препарат ИФНа-2b	21 ± 4	370 ± 51	$17,62 \pm 5,78$		

Таблица 2. Интенсивность флюоресценции полимерных микрокапсул с включением FITC-меченого ИФН α-2b

Таблица 3. Высвобождение и противоопухолевое действие микрокапсул с расчётной активностью ИФН α-2b 1 · 10⁶ ME/г PLGA при трёхсуточном растворении или сокультивировании с клетками-мишенями

Концентрация микрокапсул, мг/мл	Присутствие ИФН α-2b в микрокапсулах	Концентрация ИФН α-2b в среде инкубации с клетками- мишенями, пг/мл	Число жизнеспособных опухолевых клеток линии Jurkat, $\times 10^6$ /мл
0,75	+	23,07 (22,19–23,56)	2,18 (1,22–2,32)*,**
	—	—	2,71 (2,60–2,94)
1,5	+	23,95 (22,38–25,32)	1,98 (1,68–3,33)
	—	—	1,68 (1,19–2,22)*
3,0	+	26,69 (25,9–26,72)***	0,94 (0,61–0,94)*
	—	—	0,82 (0,74–0,86)*
0	_	0	3,38 (2,61–4,54)

Примечание. Ме (Q_1-Q_3) , n = 8, *p < 0.05 при сравнении с контролем жизнеспособности клеток (точка "0"), **p < 0.05 при сравнении с показателем жизнеспособности без ИФН α -2b, ***p < 0.05 с показателями при концентрации микро-капсул 0.75 и 1.5 мг/мл.

Улучшение монодисперсности распределения и сферичности микрокапсул с PLGA, количественная оценка эффективности инкапсуляции и нагрузки ИФН α-2b, фармакокинетики и фармакодинамики его инкапсулированной формы являются планируемыми задачами для нашей дальнейшей работы.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории физико-химических методов анализа Томского государственного университета за исследования методами ЯМР и газовой хроматографии.

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Минобрнауки России, соглашение № 14.575.21.0164 от 26.09.2017 (уникальный идентификатор RFMEFI57517X0164) в рамках Федеральной целевой программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Danhier F., Ansorena E., Silva J.M., Coco R., Breton A., Préat V. // J. Control. Release. 2012. V. 161. № 2. P. 505–522.
- Freiberg S., Zhu X.X. // Intern. J. Pharmaceutics. 2004.
 V. 282. P. 1–18.

ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК том 484 № 6 2019

- 3. Bock N., Dargaville T.R., Woodruff M.A. // Prog. Polym. Sci. 2012. V. 37. № 11. P. 1510–1551.
- Mir M., Ahmed N., Rehman A.U. // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2017. V. 159. P. 217–231.
- Биологические методы лечения онкологических заболеваний / Под ред. В.Т. ДеВита, С. Хеллмана, С.А. Розенберга. М.: Медицина, 2002. С. 362–381.
- Danks L., Takayanagi H. Immunology and Bone // J. Biochem. 2013. V. 154. P. 29–39.
- Timin A.S., Gould D.J., Sukhorukov G.B. // Expert Opin. Drug. Del. 2017. V. 14. № 5. P. 583–587.
- Kurzina I.A., Pukhova I.V., Botvin V.V., Filimoshkin A.G., Savkin K.P., Oskomov K.V., Oks E.M., Pukhova I.M. // AIP Conf. Proc. 2015. V. 1688. P. 030033-1–030033-7.
- Botvin V., Pozdniakov M., Filimoshkin A. // Polymer Degradation and Stability. 2017. V. 146. P. 126–131.
- 10. *Hungerford G., Benesch J., Mano J.F., Reis R.L.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2007. V. 67. № 2. P. 152–158.
- 11. Xie J., Lim L.K., Phua Y., Hua J., Wang C.H. // J. Colloid Interface Sci. 2006. V. 302. № 1. P. 103–112.
- Sánchez A., Tobío M., González L., Fabra A., Alonso M.J. // Eur. J. Pharm. Sci. 2003. V. 18. № 3/4. P. 221–229.
- Yang F., Song F.L., Pan Y.F., Wang Z.Y., Yang Y.Q., Zhao Y.M., Liang S.Z., Zhang Y.M. // J. Microencapsul. 2010. V. 27. № 2. P. 133–141.
- Berezovskaya I.V. // Pharmaceutical Chem. J. 2003.
 V. 37. № 3. P. 139–141.

ELECTROSPRAY PREPARATION OF BIOCOMPATIBLE LACTIDE—GLYCOLIDE COPOLYMER CAPSULES WITH INCORPORATION OF INTERFERON

I. A. Khlusov, E. V. Kibler, V. L. Kudryavtseva, S. I. Tverdokhlebov, E. N. Bolbasov, V. V. Botvin, A. D. Latypov, N. D. Gazatova, L. S. Litvinova, Academician of the RAS V. M. Buznik, Academician of the RAS E. L. Chovnzonov

Received September 12, 2018

The electrospray method was used for the first time to prepare polymeric capsules from bioresorbable *dl*-lactide and glycolide copolymer loaded with biological molecules from the cell secretome and, in particular, human interferon α -2b (IFN α -2b). The obtained nearly spherical submicron capsules were studied by scanning electron and confocal laser microscopy. The capsules retain the structural integrity and the cytotoxic activity of IFN α -2b towards tumor cells. The electrospray method is distinguished by high adaptability and environmental safety and is suitable for manufacture of a broad range of materials with different composition and morphology promising for the targeted delivery of drugs and biological molecules.

Keywords: ionic-coordinate polymerization, PLGA microcapsules, human recombinant interferon- α , scanning electron microscopy, confocal scanning laser microscopy, *in vitro* biodegradation, cytotoxicity.