

## НАНОБИОМЕДИЦИНА И НАНОФАРМАЦЕВТИКА

УДК 661.124+541.64

### СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ АЛЬБУМИНА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ И ИНКОРПОРИРОВАННЫМИ ФЛУОРОФОРАМИ И ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ, СВОЙСТВА И ПРОФИЛИ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ

© 2024 г. Г. А. Шульмейстер<sup>1</sup>, Ю. Д. Чекменева<sup>1,2</sup>, М. А. Байбакова<sup>1</sup>, Д. В. Королев<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет “ЛЭТИ” им. В.И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный университет им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

\*E-mail: dimon@cardioprotect.spb.ru

Поступила в редакцию 11.03.2024 г.

После доработки 22.04.2024 г.

Принята к публикации 22.04.2024 г.

Реализован синтез наночастиц альбумина последовательно методами рН-коацервации, десольвации и сшивки глутаровым альдегидом. Полученные частицы имеют форму, близкую к сферической. Обнаружена зависимость размеров получаемых частиц от скорости десольвации. Проведена иммобилизация на поверхности наночастиц двух флуоресцентных красителей – индоцианина зеленого и флуоресцеина натрия, а также противоопухолевого препарата квинакрин, что позволило получить пролонгированные формы. Для квинакрин, иммобилизованного на поверхности наночастиц, заметное высвобождение квинакрин заканчивается к 30 ч от начала эксперимента и составляет 65% иммобилизованного действующего вещества. Флуоресцентные красители не высвобождаются.

DOI: 10.56304/S1992722324601745

#### ВВЕДЕНИЕ

Альбумин (Alb) все чаще используется в качестве популярного материала для таргетной доставки и средств контрастирования в обеспечении эффективной биомедицинской визуализации и терапии [1]. Альбумин обладает нетоксичностью, неиммуногенностью, биоразлагаемостью и биосовместимостью. В последние годы растет число исследований, изучающих использование наночастиц (НЧ) на основе Alb различными способами [2]. Связанные с НЧ Alb лекарственные молекулы обеспечивают более длительную циркуляцию в крови и таргетное воздействие на мишени [1, 2]. Часто Alb-наночастицы покрывают различными молекулами с функциональными группами [3], такими как гиалуроновая кислота [4], хитозан [5] и т.п. При этом Alb является транспортным белком и содержит большое количество собственных функциональных групп [1–4]. НЧ Alb применяются в различных целях. Так, НЧ Alb предлагаются использовать в пищевых технологиях для сорбирования куркумина [6], для доставки лютеина – важного метаболического агента для зрения – потенцированы НЧ Alb, полученные из жмыха семян камелии и покрытые природным полисахаридом хитозаном [5]. Существуют НЧ Alb, спо-

собные преодолевать гематоэнцефалический барьер [7]. Для этого их модифицируют пептидом LMWP.

Наибольшее количество работ отмечается в области онкологии [8], в том числе для адресной доставки новых цитостатиков, таких как абраксан [9–11]. Например, для этого используется лиганд-модифицированный Alb [12]. Разработаны НЧ Alb, содержащие иммуномодуляторы-ингибиторы PI3K $\gamma$  и паклитаксел, эффективные против метастазирования [13]. Одновременное инкорпорирование в НЧ Alb двух препаратов куркумина и доксорубина (DOX) дает синергический эффект [14]. Против рака молочной железы применяются НЧ Alb, нагруженные DOX и таргетным пептидом TNBC [15]. Для нерастворимого в воде цитостатика доцетаксела предложена суспензия на основе НЧ Alb [16]. Ограничения применения глюкозооксидазы ввиду короткого периода полураспада, низкой стабильности и высокой токсичности сняты с НЧ Alb конъюгированием [17]. Синтезированы НЧ перфтортрибутиламина [18], покрытые сывороточным Alb человека, для подавления фактора роста- $\beta$ , способствующего метастазированию. Для фототермической терапии опухолей в [19] предложено использовать НЧ магнетита, покры-

тые Alb. Синтезированы НЧ Alb, нагруженные флуоресцентным красителем индоцианиновым зеленым (ИЦЗ) и DOX [20], обеспечивающие двойную терапию – фототермическую и доксорубициновую.

Используются НЧ Alb и в различных контрастах. НЧ Alb, содержащие контрастный агент – йогексол, обладают повышенной контрастирующей способностью на КТ за счет более длительного пребывания в крови [21]. НЧ Alb, конъюгированного с TDPA комплексом гадолиния, потенциально могут использоваться для МРТ-контрастирования [22].

Для синтеза НЧ Alb применяются различные методы, такие как десольватация, эмульгирование, термическое гелеобразование, нанораспылительная сушка, паб-технология и самосборка [23, 24], сшивка различными сшивающими агентами [25]. Для доставки DOX предложено использовать НЧ Alb, сшитые стеариновой, олеиновой и линолевой кислотами [25]. Описан метод [26] соосаждения DOX с Alb в процессе десольватации и сшивки НЧ Alb. В [27–29] в качестве альтернативы для синтеза НЧ сывороточного Alb предложен метод десольватации. При получении НЧ Alb этим способом альбумин растворяют в воде, десольватируют этанолом, затем стабилизируют добавлением сшивающего агента, в качестве которого используют глутаровый альдегид. Данный метод получил широкое распространение и используется для синтеза НЧ Alb многими исследователями [30–33].

Цель данного исследования – разработка метода синтеза наночастиц альбумина, иммобилизация на их поверхности флуорофоров ИЦЗ и флуоресцеина натрия (ФЛН) для пролонгации времени наблюдения на флуоресцентном томографе и иммобилизация препарата квинакрин для реализации пассивной направленной доставки в миокард для постишемического восстановления [34].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Материалы.** В качестве действующего вещества использовали квинакрин (мепакрин, акрихин) Quinacrine dihydrochloride  $\geq 90\%$  (Sigma Aldrich, Германия).

В качестве флуорофоров применяли флуоресцентный краситель ИЦЗ, допущенный для клинического применения (Acros Organics, Israel) и ФЛН ЧДА (Вектон, Санкт-Петербург, РФ).

При изготовлении НЧ Alb использовали Human Albumin 20% (Octapharma, Austria). Дегидратацию проводили этанолом медицинским 95% (РФ). В качестве сшивающего агента использовали глутаровый альдегид (Sigma Aldrich, USA, Cas: 111-30-8).

**Определение физико-химических характеристик.** Гидродинамический диаметр наноматериалов и индекс полидисперсности в водных растворах определяли при помощи метода динамического рассеивания света (ДРС) на приборе Zeta Sizer Ultra (Malvern Instruments, UK). Использовали следующие параметры прибора: время накопления корреляционной функции – 120 с, распределение по размерам измеряли в трех повторях, температура образца – 25°C, метод анализа – General Purpose. Дополнительные настройки были выставлены по умолчанию. Обеспыливание коллоидного раствора не проводили. За средний гидродинамический размер принимали значение Z-average, которое рассчитывали по первичным данным Size Distribution Intensity.

Спектрофотометрические характеристики материалов определяли при помощи спектрофотометра Unico 2802s (Unico Sys, USA) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Морфологию нанолипосом изучали при помощи просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ) HT7800 Series (Hitachi, Japan). Использованы подложки Nickel Grids Formvar Support Films 200 Mesh (Zongjingkei Technology, China).

**Определение количества флуорофоров.** Для определения количества флуорофоров использовали спектрофотометрический метод. Построение калибровочной зависимости оптической плотности раствора от концентрации делали для проб с содержанием флуорофора 0.0039, 0.0043, 0.0049, 0.0056, 0.0065, 0.0078 и строили калибровочную зависимость, по которой затем определяли количество вещества в пробах.

Для ИЦЗ длина волны поглощения составляла 700 нм, для флуоресцеина – 485 нм.

Для определения количества квинакрин использовали спектрофотометрический метод. Построение калибровочной зависимости оптической плотности раствора от концентрации делали для проб с содержанием квинакрин 0.0039, 0.0043, 0.0049, 0.0056, 0.0065, 0.0078 и строили калибровочную зависимость при длине волны поглощения 279 нм, по которой затем определяли количество вещества в пробах.

**Исследование кинетики высвобождения квинакрин.** Для изучения профиля высвобождения действующего вещества – квинакрин – использовали следующий метод. Образец с иммобилизованным или инкапсулированным квинакрином объемом 15 мл помещали в диализный мешок с диаметром пор 3.5 кДа, шириной 46 мм, длиной 120 мм. Край мешка фиксировали стандартными зажимами. Собранный мешок помещали в полипропиленовый стакан объемом 1000 мл, в который заливали 500 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) с pH = 7.4. Образец перемешивали на магнитной мешалке со скоростью 150 с<sup>-1</sup>. Проводили

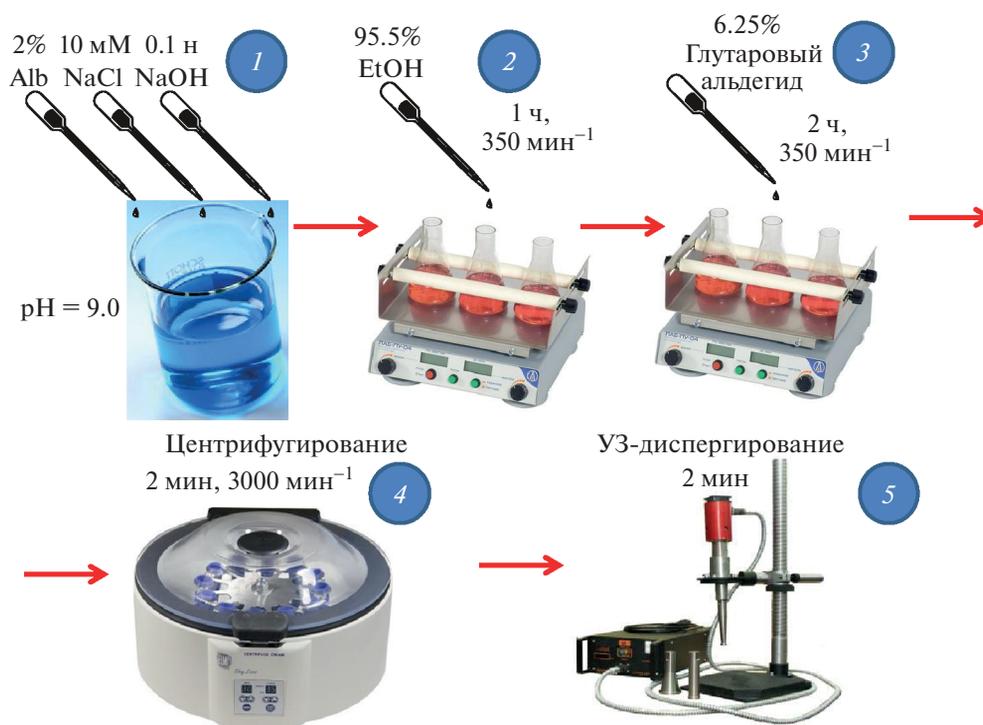


Рис. 1. Схема синтеза наночастиц альбумина.

периодический отбор проб объемом 2 мл. Этот объем компенсировали PBS-буфером. Отобранную пробу анализировали спектрофотометрически.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для синтеза наночастиц альбумина использовали метод pH-коацервации. Готовили 2 мл 2%-ного раствора Alb в растворе 10 мМ NaCl с pH = 9, подщелаченный 0.1 н NaOH. Капельно с помощью шприца добавляли 8 мл этанола при перемешивании 350 об./мин на орбитальном шейкере со скоростью 0.1–0.3 мл/мин (30 мин и 1 ч). Далее сшивали с 6.25%-ным глутаровым альдегидом в объеме 59 и 118 мкл. Оставляли перемешиваться на 2 ч. Схема синтеза НЧ Alb показана на рис. 1.

При более медленном (60 мин) добавлении этанола в раствор Alb коллоид мутнеет после добавления 4–4.5 мл и впоследствии имеет прозрачность. При 30-минутном добавлении этанола раствор становится молочного цвета.

Для получения биологически совместимого образца НЧ Alb было необходимо избавиться от этилового спирта в дисперсной среде и заменить его на физиологический раствор. Для этого проводили диализ в диализном мешке с размером пор 3.5 кДа в стеклянном химическом стакане объемом 2000 мл. Образец двукратно ставили против воды при перемешивании со скоростью

200 мин<sup>-1</sup> на магнитной мешалке в течение 1 ч. Затем диализ проводили против физиологического раствора при тех же параметрах.

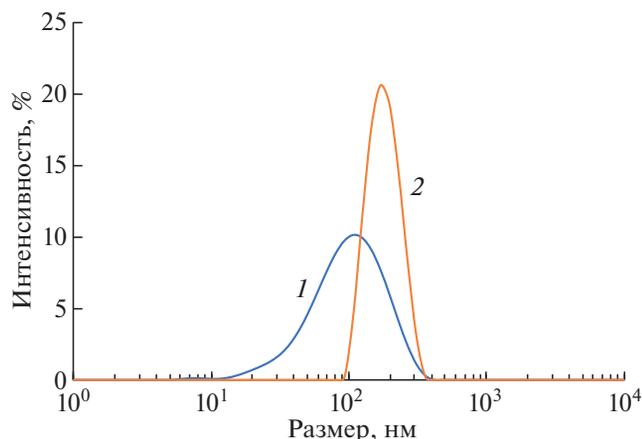
Для иммобилизации либо инкорпорирования квинакрина, ИЦЗ или ФЛН (действующее вещество, ДВ) готовили их водные растворы. Для приготовления растворов квинакрина и ИЦЗ 10 мг ДВ растворяли в 10 мл дистиллированной воды. Поскольку ФЛН представляет собой не растворимую в воде кислоту, 10 мг ФЛН заливали 10 мл дистиллированной воды. Затем водородный показатель раствора доводили до значения pH = 9.0 0.1 н раствором NaOH. При этом получали ФЛН, который образовывал водный раствор.

Использовали два способа иммобилизации ДВ:

- поверхностная иммобилизация при помощи ионной связи ДВ с поверхностными функциональными группами Alb-НЧ;
- физическое инкорпорирование ДВ в материал НЧ.

При первом способе иммобилизации коллоидный раствор НЧ смешивали в соотношении 1 : 1 с раствором ДВ. Образец перемешивали на орбитальном шейкере в течение 2 ч при скорости 350 мин<sup>-1</sup>.

При втором способе иммобилизации раствор ДВ готовили непосредственно в Alb и затем проводили сшивание НЧ по указанной схеме.



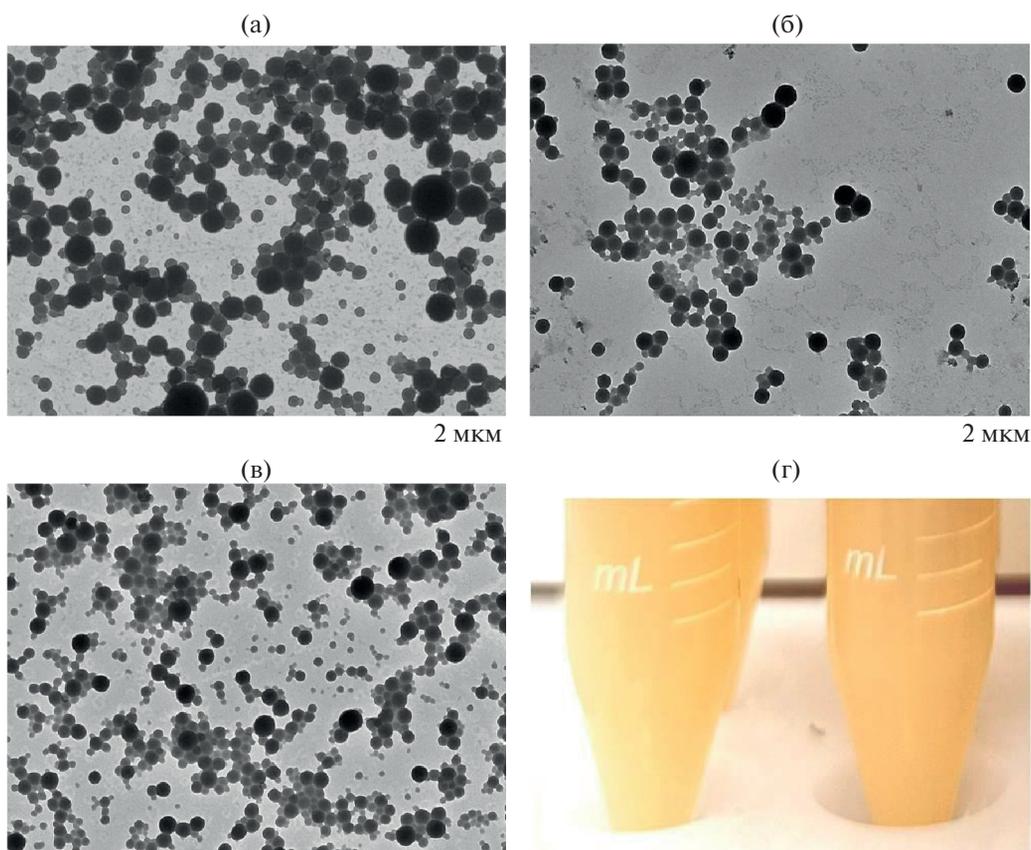
**Рис. 2.** Распределение НЧ альбумина по размерам (ДРС): 1 – 30, 2 – 60 мин.

*Изучение размеров, морфологии и электрокинетического потенциала получаемых глобул. От скорости подачи этанола зависят размеры получаемых НЧ Alb. Так, при подаче этанола в течение 30 мин преимущественные размеры составляли*

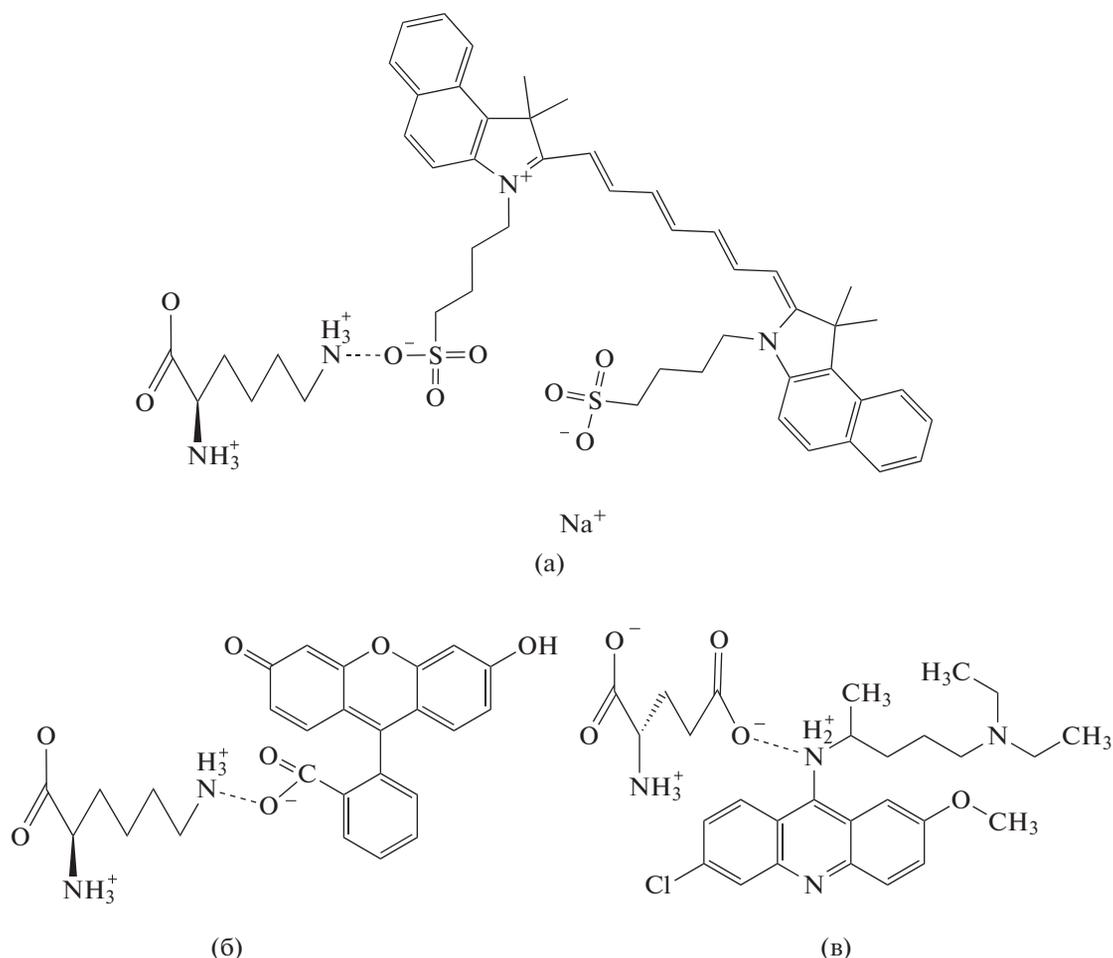
от 80 до 115 нм, при добавлении в течение 60 мин – 170–180 нм при изучении методом ДРС (рис. 2).

При изучении морфологии и размера НЧ Alb при помощи ПЭМ обнаружено, что НЧ Alb имеют размеры, схожие с определенными методом ДРС и по форме близки к сферическим (рис. 3). Причем зависимость среднего размера глобул от различной длительности добавления этанола также четко прослеживается.

Для определения количества действующих веществ, иммобилизованных на поверхности НЧ либо инкорпорированных в них, проводили диализ образцов в диализном мешке с диаметром пор 3.5 кДа, шириной 46 мм, длиной 120 мм против дистиллированной воды. Затем отбирали пробы и проводили их спектрофотометрический анализ. В отобранных пробах не было обнаружено ДВ. Это говорит о том, что ДВ полностью связывались материалом носителя (НЧ). Предположительно, механизм связывания НЧ альбумина с ДВ – координационно-ионный и происходит за счет функциональных групп Alb. На поверхности НЧ должно присутствовать большое количество не сшитых функциональных групп. Именно этим можно объяснить большую емкость и плотность привив-



**Рис. 3.** ПЭМ-изображения образца НЧ альбумина: а – с иммобилизованным ИЦЗ (образец получен при добавлении этанола в течение 60 мин); б – с иммобилизованным флуоресцеином, в – с иммобилизованным квинакрином (образцы получены при добавлении этанола в течение 30 мин); г – макровид препарата НЧ Alb.



**Рис. 4.** Образование ионных связей аминокислот с действующими веществами: а – лизин–индоцианин зеленый, б – лизин–флуоресцеин, в – глутаминовая кислота–квинакрин.

ки ДВ на поверхности НЧ Alb. Флуоресцеин и ИЦЗ должны взаимодействовать со свободными аминогруппами в боковой цепи Alb (например лизина, рис. 4). При этом наиболее прочно должен связываться с альбумином ИЦЗ, поскольку имеет два кислотных остатка сильной кислоты (сульфогруппы). Более слабую связь должен давать флуоресцеин ввиду наличия для связывания карбоксильной группы, способной к гидролизу, хотя практические эксперименты показали, что высвобождения ФЛН в течение длительного времени не происходит. Квинакрин имеет в своем составе вторичный амин и должен связываться с аминокислотами Alb, имеющими в боковой цепи карбоксильную группу (например глутаминовая кислота, рис. 4). Эта связь также теоретически подвержена гидролизу и, возможно, кинетика высвобождения квиакрина контролируется скоростью гидролиза этой связи.

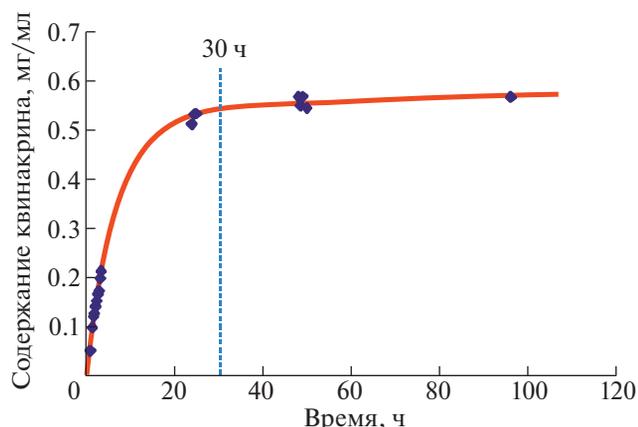
Для квиакрина, иммобилизованного на поверхности НЧ Alb (рис. 5), заметное высвобождение ДВ заканчивается к 30 ч от начала экспери-

мента. При этом высвобождается 65% иммобилизованного ДВ. По-видимому, при этом устанавливается некоторое термодинамическое равновесие между иммобилизованным и свободным квиакрином, что препятствует его дальнейшему высвобождению.

Для квиакрина, инкорпорированного в НЧ Alb, исследование кинетики высвобождения не проводили, поскольку оно слишком велико и не имеет практического значения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Реализован синтез наночастиц альбумина последовательно методами рН-коацервации, десольвации и сшивки глутаровым альдегидом. Полученные частицы имеют форму, близкую к сферической. Обнаружена зависимость размеров получаемых частиц от скорости десольвации. Так, при времени десольвации 30 мин преимущественный размер составил 80–115 нм, а при времени 60 мин – 170–180 нм. Проведена иммобили-



**Рис. 5.** Кинетика высвобождения квинакрин, иммобилизованного на поверхности НЧ Алб.

зация на поверхности НЧ двух флуоресцентных красителей — индоцианина зеленого и флуоресцеина натрия. Это предположительно позволит увеличить время исследования флуоресценции с нескольких секунд до нескольких десятков минут. Иммобилизован противоишемический препарат квинакрин, что позволило получить его пролонгированную форму. В нативном виде он выводится из организма органами ретикулоэндотелиальной системы в течение нескольких секунд. Заметное высвобождение из пролонгированной формы заканчивается к 30 ч от начала эксперимента и составляет 65% иммобилизованного действующего вещества. Также иммобилизация квинакрин на поверхности альбуминовых НЧ способна реализовать пассивную направленную доставку в миокард для его постишемического восстановления [34].

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-15-00151).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Yhee J.Y., Lee J., Chang H. et al. // Curr. Pharm. Des.* 2015. V. 21 (14). P. 1889. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150302115809>
2. *Tan Y.L., Ho H.K. // Drug Discov. Today.* 2018. V. 23 (5). P. 1108. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.051>
3. *Kunde S.S., Wairkar S. // Colloids Surf. B.* 2022. V. 213. P. 112422. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112422>
4. *Lei C., Liu X.R., Chen Q.B. et al. // J. Control. Release.* 2021. V. 331. P. 416. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.033>
5. *Yu N., Shao S., Huan W. et al. // Food Chem.* 2022. V. 389. P. 133032. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133032>

6. *Minetti F., Mengatto L.N., Laura Olivares M., Berli C.L.A. // Food Res. Int.* 2022. V. 162. Pt A. P. 111984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111984>
7. *Lin T., Zhao P., Jiang Y. et al. // ACS Nano.* 2016. V. 10 (11). P. 9999. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b04268>
8. *Solanki R., Rostamabadi H., Patel S., Jafari S.M. // Int. J. Biol. Macromol.* 2021. V. 193. Pt A. P. 528. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.040>
9. *Spada A., Emami J., Tuszyński J.A., Lavasanifar A. // Mol. Pharm.* 2021. V. 18 (5). P. 1862. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046>
10. *Kianfar E. // J. Nanobiotechnol.* 2021. V. 19 (1). P. 159. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00896-3>
11. *Kouchakzadeh H., Safavi M.S., Shojaosadati S.A. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2015. V. 98. P. 121. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.002>
12. *Fu Y., Yang S., Liu Y. et al. // Macromol. Biosci.* 2022. V. 22 (3). P. e2100404. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100404>
13. *Song Y., Bugada L., Li R. et al. // Sci. Transl. Med.* 2022. V. 14 (643). P. eabl3649. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl3649>
14. *Kim B., Seo B., Park S. et al. // Colloids Surf. B.* 2017. V. 158. P. 157. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.039>
15. *Pal S., G.B.R., Mohny F.P. et al. // ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2023. V. 15 (40). P. 46721. <https://doi.org/10.1021/acscami.3c11561>
16. *Su Z., Zhao J., Zhao X. et al. // Int. J. Pharm.* 2023. V. 635. P. 122711. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122711>
17. *Lee C. // Colloids Surf. B.* 2023. V. 226. P. 113335. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113335>
18. *Luo L., Zhang B., Tao F. et al. // ACS Nano.* 2023. V. 17(16). P. 15388. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c00295>
19. *Ma J., Zhang Y., Sun H. et al. // J. Mater. Chem. B.* 2022. V. 10 (22). P. 4226. <https://doi.org/10.1039/d2tb00396a>
20. *Shen H., Gao Q., Liu T. et al. // Curr. Drug Deliv.* 2022. V. 19 (1). P. 49. <https://doi.org/10.2174/1567201819666211229120611>
21. *Kale T., Bendale K., Singh K.K., Chaudhari P. // J. Biomed. Nanotechnol.* 2019. V. 15 (2). P. 236. <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2690>
22. *Wallnöfer E.A., Thurner G.C., Kremser C. et al. // Histochem Cell Biol.* 2021. V. 155 (1). P. 19. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01919-0>
23. *Elzoghby A.O., Samy W.M., Elgindy N.A. // J. Control. Release.* 2012. V. 157 (2). P. 168. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
24. *An F.F., Zhang X.H. // Theranostics.* 2017. V. 7 (15). P. 3667. <https://doi.org/10.7150/thno.19365>
25. *Yang Y., Li X., Song J. et al. // Nano Lett.* 2023. V. 23 (4). P. 1530. <https://doi.org/10.1021/acsnanolett.2c04976>
26. *Aziz A., Sefidbakht Y., Rezaei S. et al. // J. Pharm. Sci.* 2022. V. 111 (4). P. 1187. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.12.006>

27. *Weber C., Kreuter J., Langer K.* // *Int. J. Pharm.* 2000. V. 196 (2). P. 197.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00420-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00420-2)
28. *Langer K., Balhassar S., Vogel V. et al.* // *Int. J. Pharm.* 2003. V. 257 (1–2). P. 169.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(03\)00134-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(03)00134-0)
29. *Kufleitner J., Wagner S., Worek F. et al.* // *J. Microencapsul.* 2010. V. 27 (6). P. 506.  
<https://doi.org/10.3109/02652041003681406>
30. *Sebak S., Mirzaei M., Malhotra M. et al.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2010. V. 5. P. 525.  
<https://doi.org/10.2147/ijn.s10443>
31. *Cui W., Wang A., Zhao J. et al.* // *J. Colloid Interface Sci.* 2016. V. 465. P. 11.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.11.054>
32. *Qu N., Lee R.J., Sun Y. et al.* // *Int. J. Nanomedicine.* 2016. V. 11. P. 3451.  
<https://doi.org/10.2147/IJN.S105420>
33. *Lomis N., Westfall S., Farahdel L. et al.* // *Nanomaterials (Basel).* 2016. V. 6 (6). P. 116.  
<https://doi.org/10.3390/nano6060116>
34. *van Bilsen M., van der Vusse G.J., Willemssen P.H. et al.* // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1990. V. 22 (2). P. 155.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2828\(90\)91112-k](https://doi.org/10.1016/0022-2828(90)91112-k)