

Ковшова Татьяна Сергеевна

**Биофармацевтический анализ наносомальной формы доксорубина на основе
сополимера молочной и гликолевой кислот**

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» и в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент



Балабаньян Вадим Юрьевич

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор



Гельперина Светлана Эммануиловна

Официальные оппоненты:

Эпштейн Наталья Борисовна – доктор фармацевтических наук, доцент, Обнинский институт атомной энергетики — филиал Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», отделение биотехнологий, профессор

Успенская Елена Валерьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, Медицинский институт Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра фармацевтической и токсикологической химии, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «22» сентября 2021 г. в 13 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.01

доктор фармацевтических наук,
профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время общая смертность от злокачественных новообразований во всем мире продолжает расти и по данным ВОЗ составит 13,1 млн в 2030 году. Антрациклиновый антибиотик доксорубицин (Dox) представляет собой один из наиболее изученных и эффективных химиотерапевтических препаратов и применяется для лечения широкого спектра солидных злокачественных новообразований и гемобластозов. Вместе с тем, для лечения злокачественных новообразований мозга – глиобластом Dox не применяется, поскольку является субстратом Р-гликопротеина, ввиду чего не проникает через гематоэнцефалический барьер в терапевтически значимых концентрациях. В качестве направления модификации лекарственной формы может выступать создание наноразмерных систем доставки Dox, которые могли бы преодолевать ГЭБ и эффективно доставлять Dox в мозг. Создание лекарственных форм (ЛФ) на основе коллоидных носителей, в том числе наночастиц (НЧ) на основе биodeградируемых полимеров, таких как сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA) является одним из наиболее перспективных направлений современной фармацевтической технологии (Rezvantala S. et al., 2018; Castro K. C., 2020).

Наносомальная форма Dox на основе PLGA НЧ (PLGA-Dox), модифицированных полуксамером 188 (P188), проявила высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс (Gelperina S. et al., 2010; Wohlfart S. et al., 2011). В то же время влияние физико-химических параметров наносомальной формы на профиль высвобождения Dox *in vitro* и фармакокинетику *in vivo* остается недостаточно изученным. Высокая противоопухолевая активность и безопасность данной формы (Filon O. et al., 2017; Pereverzeva E. et al., 2019), свидетельствующие о ее перспективности для клинического применения, послужили обоснованием необходимости углубленного исследования факторов, влияющих на высвобождение Dox из PLGA-Dox НЧ *in vitro* и *in vivo*, что, в свою очередь, потребовало проведения углубленного биофармацевтического анализа наносомальной формы с учетом особенностей ЛФ на основе коллоидных носителей.

Степень разработанности научной проблемы. Нагруженные Dox НЧ, модифицированные P188, ранее продемонстрировали высокий противоопухолевый эффект в отношении интракраниальной глиобластомы 101/8 у крыс при внутривенном введении, который проявлялся в виде значительного увеличения продолжительности жизни животных и гистологически подтвержденного ингибирования роста опухоли, что свидетельствовало об эффективной доставке Dox через ГЭБ в опухоль (Gelperina S. et al., 2010; Wohlfart S. et al., 2011). Ранее было показано, что основным механизмом интернализации НЧ в клетки глиобластомы человека U87MG является клатрин-зависимый эндоцитоз (Malinovskaya Y. et al., 2017). Подтверждена хорошая гемосовместимость данной формы (Maksimenko O. et al., 2019). Результаты доклинического токсикологического исследования данной формы показали, что

включение Dox в состав PLGA НЧ, покрытых P188, позволило снизить его кардио- и тесстикулярную токсичность, а также гематотоксичность (Pereverzeva E. et al., 2019). Клиническое исследование I фазы у пациентов с рецидивирующими солидными опухолями, включая мультиформную глиобластому, выявило удовлетворительный профиль безопасности и переносимости наносомальной формы Dox в дозах до 90 мг/м² (Filon O. et al., 2017). Вместе с тем, остаются до конца не решенными аспекты фармацевтической разработки, связанные с оценкой степени включения и профиля высвобождения Dox из полимерной матрицы и установлением взаимосвязи этих параметров с фармакокинетическими параметрами наносомальной формы.

Целью настоящего исследования явилось получение, биофармацевтический анализ и изучение фармакокинетики наносомальных форм доксорубина на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) с различным профилем высвобождения доксорубина.

Задачи исследования:

- Разработать методы получения наносомальных форм доксорубина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) с различным профилем высвобождения доксорубина.
- Исследовать физико-химические параметры наносомальных форм и профиль высвобождения доксорубина из полимерной матрицы *in vitro*.
- Изучить распределение полученных наносомальных форм доксорубина между плазмой и эритроцитами крови и их гемосовместимость.
- Разработать и валидировать биоаналитические методики количественного определения свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) доксорубина в плазме крови для исследований *in vitro* и *in vivo*.
- Исследовать фармакокинетику наносомальных форм с различным профилем высвобождения доксорубина в плазме крови крыс при однократном внутривенном введении;
- Оценить возможность прогнозирования профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vivo* на основании анализа фармакокинетических данных зависимости «концентрация в плазме – время» с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели.

Научная новизна.

- Выявлены факторы, обеспечивающие возможность получения наночастиц на основе PLGA с заданными физико-химическими параметрами и профилем высвобождения доксорубина: pH внешней водной фазы эмульсии, молекулярный вес PLGA, наличие и количество концевых карбоксильных групп PLGA, введение противоиона для получения гидрофобного комплекса с доксорубином.
- Изучено влияние параметров наносомальной формы доксорубина на распределение между плазмой и эритроцитами крови человека. Установлено, что включенный в наночастицы

доксорубицин в эксперименте *in vitro*. связывается с эритроцитами крови человека в меньшей степени, чем свободный доксорубицин.

- Изучена фармакокинетика наносомальных форм с различным профилем высвобождения доксорубицина. По сравнению с субстанцией наносомальные формы доксорубицина отличались более высокими значениями AUC и, особенно, $AUC_{0 \rightarrow 1h}$, низким значением клиренса и низким объемом распределения, что свидетельствует о влиянии лекарственной формы на биораспределение доксорубицина.
- Исследована возможность прогнозирования профиля высвобождения доксорубицина из PLGA-Dox НЧ *in vivo* на основании экспериментально полученных фармакокинетических данных зависимости «концентрация в плазме – время» с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели. Более высокая степень включения и, соответственно, низкая скорость высвобождения доксорубицина в модельных средах и плазме *in vitro*, коррелировала с более высокой спрогнозированной скоростью высвобождения доксорубицина *in vivo* и более высокой нацеливающей способностью наносомальной формы.

Теоретическая и практическая значимость. Выявлены параметры, определяющие качество наносомальной формы Dox на основе PLGA. Оптимизированы методики стандартизации наносомальной формы Dox, в том числе методы анализа физико-химических параметров наночастиц (размер и распределение по размерам, ζ -потенциал поверхности, количественное содержание Dox и PLGA, примесей и вспомогательных веществ, степень включения и нагрузка Dox в НЧ, остаточное содержание воды), профиля гидролитической деградации НЧ, а также профиля высвобождения Dox из НЧ *in vitro* в модельные среды и плазму. Разработанные в данном исследовании подходы к получению и анализу наноразмерных форм на основе PLGA с заданным профилем высвобождения Dox в дальнейшем могут быть использованы для прогнозирования фармакокинетики и противоопухолевой активности наносомальной формы Dox *in vivo* путем установления *in vitro* / *in vivo* корреляций (IVIVC). Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности включения показателя «профиль высвобождения доксорубицина» в нормативную документацию на готовое лекарственное средство. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, внедрены в деятельность лаборатории готовых лекарственных средств Санкт-Петербургского Института Фармации, а также в учебный процесс кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «МГУ имени М. В. Ломоносова».

Основные положения, выносимые на защиту:

- Методы получения наносомальных форм доксорубицина на основе PLGA с различной степенью включения и профилем высвобождения доксорубицина.
- Физико-химические параметры наносомальных форм и профиль высвобождения доксорубицина из полимерной матрицы *in vitro* и методы их изучения.
- Различия в распределении свободного и включенного в PLGA-Dox НЧ между плазмой и

эритроцитами крови.

– Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубина с различным профилем высвобождения доксорубина, рассчитанные внемоделльным методом и с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) и конкретно пунктам 2, 3 и 4 паспорта специальности:

2 - Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств.

3 - Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

4 - Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы.

Личный вклад автора. Автор принимал непосредственное участие в получении наносомальных форм доксорубина с различным профилем высвобождения; оптимизации методов и проведении их физико-химического анализа; проведении исследований кинетики высвобождения Dox из НЧ *in vitro* в модельных средах и плазме крови, профиля гидролитической деградации НЧ; проведении фармакокинетического исследования (разработка дизайна исследования, отбор проб, оптимизация методики пробоподготовки, количественный анализ Dox в плазме крови крыс); проведении исследования по оценке взаимодействия PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови и оценке гемолитической активности НЧ; а также анализе и оформлении полученных результатов и подготовке публикаций.

Апробация, внедрение, публикации. Апробация диссертации была проведена на заседании кафедры фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела МГУ им. М.В. Ломоносова (протокол № 1 от 10.02.2021) и на расширенном заседании кафедры Химии и технологии биомедицинских препаратов с участием сотрудников Инжинирингового центра «Продукты и технологии органического синтеза» РХТУ им. Д. И. Менделеева (протокол № 5 от 10.02.2021 г.)

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 20-015-00276 «Поиск *in vitro* / *in vivo* корреляций для прогнозирования фармакокинетики и противоопухолевой активности наносомальной формы доксорубина» и №19-015-00155 «Изучение зависимости релиза активного компонента из полилактидных нано- и микроразмерных лекарственных форм от профиля их гидролитической деградации». Основные материалы исследования отражены в 7 публикациях, среди которых 4

статьи в журналах, индексируемых в международных базах цитирования (Scopus и Web of Science), 3 статьи в изданиях, рекомендуемых ВАК, а также 9 тезисов докладов, представленных на международных конференциях.

Объем и структура диссертации. Диссертация работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 205 страницах, содержит 44 таблицы и 45 рисунков. Список литературы включает 318 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Получение наносомальной формы доксорубина (PLGA-Dox). PLGA-Dox НЧ получали методом гомогенизации с помощью роторного смесителя с высоким усилием сдвига Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия) и гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США), с последующим удалением органического растворителя (метод «двойных эмульсий»). В качестве внешней водной фазы эмульсии использовали 1% раствор поливинилового спирта (ПВС, 9-10 кДа) в фосфатном буфере (PBS). Весовое соотношение Dox – PLGA составляло 1:10; соотношение объема первичной эмульсии к объему внешней водной фазы – 1:5. Полученные образцы лиофилизировали (Alpha 2-4 LSCplus, Martin Christ GmbH, Германия) и хранили при +4 °С. НЧ-плацебо получали по аналогичной методике. При получении НЧ варьировали следующие параметры: кислотность внешней водной фазы двойной эмульсии (1% ПВС в PBS) при получении НЧ (pH 6,4 или 7,4); состав полимерной композиции, в том числе наличие/отсутствие концевых карбоксильных групп в молекулах PLGA (Resomer® 502H, Resomer® 502S или их смесь), молекулярный вес PLGA (10-12 кДа или 4-5 кДа, вязкость 0,2 и 0,18 дл/г, соответственно). Для получения НЧ с медленным высвобождением Dox в НЧ включали гидрофобный комплекс Dox с диоктилсульфосукцинатом натрия (AOT), либо использовали PLGA с высокой вязкостью (Lactel®, 0,66 дл/г), при этом для повышения степени включения в полимерную композицию вводили олигомер PLGA Resomer® Condensate с молекулярной массой 700-800 Да с карбоксильными концевыми группами в весовом соотношении 20:1. Для получения «отмытых» НЧ, свободный Dox отделяли методом гель-фильтрации (Sephadex® G25, GE Healthcare, Швеция). Для модификации поверхности НЧ P188 лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1% растворе P188 и инкубировали в течение 30 минут перед проведением дальнейших исследований. Для количественной оценки сорбции P188 на поверхности PLGA-Dox НЧ применяли йодометрический метод.

Методы оценки физико-химических параметров PLGA-Dox НЧ. Средний гидродинамический диаметр частиц и распределение частиц по размерам (PDI) в различных средах определяли методом динамического светорассеяния (DLS) с использованием анализаторов Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания) или NanoBrook Omni

(Brookhaven, США), при этом оценивали влияние состава дисперсионной среды (вода Milli-Q; 1% раствор P188; раствор натрия хлорида 0,9%; 10 mM раствор натрия хлорида; 1X фосфатный буфер (PBS) из таблетки; 10 mM PBS; 4% раствор человеческого сывороточного альбумина (ЧСА)), и разведения НЧ (0,1, 0,2 и 0,4 мг/мл по PLGA) на величину измеряемого гидродинамического диаметра. ζ -потенциал поверхности определяли методом микроэлектрофореза в различных средах при разведении 0,1-5 мг/мл по PLGA. Размер и морфологию НЧ оценивали при помощи просвечивающей электронной микроскопии (микроскоп JEM-1400, JEOL, Япония). Для определения содержания полимера в PLGA-Dox НЧ и остаточного содержания мономера в PLGA, а также изучения гидролитической деградации PLGA-Dox НЧ использовали метод капиллярного зонального электрофореза (Капель 105M, Люмэкс, Россия); число карбоксильных групп (кислотное число) на поверхности НЧ определяли обратным потенциометрическим титрованием; температуру стеклования определяли методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК, Mettler TA-4000, Mettler Toledo GmbH, Германия); характеристическую вязкость определяли при помощи капиллярного вискозиметра; молекулярно-массовое распределение полимеров определяли методом гель-проникающей хроматографии. Общее содержание Dox определяли спектрофотометрически (СФ, Shimadzu UV-1800, Япония); степень включения Dox оценивали косвенно по его содержанию в фильтрате/супернатанте после отделения фракции НЧ различными методами. В первом случае НЧ отделяли центрифугированием с использованием различных режимов: 1) на центрифуге 5804R (Eppendorf, Германия), ускорение $15000 \times g$, 30 мин при $+18^\circ\text{C}$; 2) на ультрацентрифуге Avanti JXN-30 (Beckman Coulter, США), ускорение $20000 \times g$ / $30000 \times g$ / $48254 \times g$ / $75000 \times g$ / $100000 \times g$, 30 мин при $+5^\circ\text{C}$. Кроме того НЧ отделяли методом ультрафильтрации на фильтрах Amicon® Ultra-0,5 (Millipore) с диаметром пор 10, 30, 50 и 100 кДа с использованием центрифуги 5804R (Eppendorf, Германия). Фракцию свободного Dox также отделяли методом гель-фильтрации (Sephadex® G25, GE Healthcare, Швеция; колонка 32×110 мм, объем геля ≈ 70 мл). Кроме того, содержание общего и включенного в НЧ Dox, а также родственных примесей Dox определяли методом ВЭЖХ (LC-20, Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектированием. Содержание ПВС в образцах НЧ определяли СФ после образования комплекса с йодом в йодиде калия (ПВС-I₂-KI) в присутствии борной кислоты. Содержание воды в образцах НЧ определяли методом термогравиметрии (ТГА, термоанализатор TGA/DSC 3+ Mettler Toledo) и кулонометрического титрования по Фишеру (титратор Фишера с генерирующим электродом без диафрагмы 831 KF Coulometer, Metrohm, Швейцария).

Изучение профиля высвобождения доксорубина из PLGA-Dox НЧ *in vitro*. Кинетику высвобождения Dox из НЧ изучали в простых модельных средах путем отделения НЧ центрифугированием, при этом варьировали следующие параметры: приемная среда (вода; 0,9% раствор хлорид натрия; PBS, pH=7,4; 1% раствор P188, 1% раствор полисорбата 80; 0,1 М

HEPES буфер, pH=7,4; 0,1 М MES буфер, pH=6,5; 0,1 М натрий-ацетатный буферный раствор, pH=4,5), степень разведения (1:5; 1:25), температура инкубации (+25 °C; +37 °C) и ускорение центрифугирования ($15000 \times g$; $48254 \times g$); а также методом диализа в воде (+37 °C); содержание свободного Dox определяли СФ. Кинетику высвобождения Dox в плазме (+37 °C) изучали методом ВЭЖХ. Математическое описание и сравнение профилей высвобождения Dox с учетом фаз быстрого («burst-effect») и продолжительного высвобождения проведено с помощью различных математических моделей, описывающих кинетику высвобождения ЛВ из полимерной матрицы, таких как модели нулевого и первого порядка, Хигучи, Хиксона-Кроуэлла и Корсмейера-Пеппаса.

Изучение взаимодействия PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови человека. Оценивали гемолитическую активность PLGA-Dox НЧ, а также распределение между плазмой и эритроцитами при инкубации в цельной крови: коэффициенты распределения $K_{\text{Blood/Plasma}}$ и $K_{\text{RBC/Plasma}}$ и степень связывания (%) с эритроцитами.

Фармакокинетику наносомальных форм Dox с разной степенью включения и профилем высвобождения Dox изучали на здоровых самках крыс Wistar (200-250 г) при однократном внутривенном введении в дозе 5 мг/кг в виде суспензии в 1% растворе P188 (2 мг/мл Dox) в сравнении с раствором субстанции Dox (Teva, Sicor, Италия) в воде в той же дозе. Образцы крови отбирали в течение 48 ч (по 6 крыс на временную точку). Концентрации свободного и общего (свободный + связанный с НЧ) Dox в плазме крови крыс на КЗ-ЭДТА определяли методом ВЭЖХ с использованием системы Agilent 1200, оснащенной диодно-матричным и флуоресцентным детекторами и колонкой ZORBAX Eclipse XDB-C18 (80Å, 5 мкм, 150 x 3 мм, Agilent Technologies, США). Для определения свободного Dox НЧ отделяли центрифугированием. Основные фармакокинетические параметры (AUC, AUC_{0→1h}, Cl, V) для свободного и общего Dox были определены с использованием Monolix Suite 2019R1 (Lixoft, Франция) внемоделным методом. Анализ фармакокинетических данных также проводили с использованием новой физиологически обоснованной биофармацевтической модели PBNB (*англ.* Physiologically-based nanocarrier biopharmaceutics model), разработанной и адаптированной для данного исследования группой проф. Маттиаса Г. Вакера (Национальный университет Сингапура), а также прогнозировали высвобождение Dox из PLGA-Dox НЧ *in vivo* (3RPT модель, *англ.* 3-parametric reciprocal powered time model) и нацеливающую способность PLGA-Dox НЧ (F_{target} , %).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Statsoft Statistica 8.1 (StatSoft Inc., США) с использованием t-критерия Стьюдента; уровень статистической значимости был установлен на уровне $p < 0,05$. Определение размера частиц, распределения по размерам и ζ-потенциала проводили в 4 повторностях, тогда как все измерения *in vitro* проводили в 3 повторностях. При определении степени включения Dox в НЧ проводили 6 параллельных измерений.

Получение PLGA-Dox НЧ и оптимизация методов оценки их физико-химических параметров и кинетики высвобождения *in vitro*

В рамках настоящей работы наночастицы PLGA-Dox НЧ с различными свойствами получали методом «двойных эмульсий» путем варьирования различных технологических параметров, таких как pH внешней водной фазы (1% ПВС в фосфатно-солевом буфере, 7,4/6,4), состав полимерной композиции (молекулярный вес полимера, наличие или отсутствие концевых карбоксильных групп PLGA), добавление противоиона (АОТ) для образования ионной пары Dox-АОТ гидрофобной природы. Для того, чтобы определить ключевые физико-химические параметры полученных наносомальных форм и впоследствии оценивать влияние этих параметров на профиль высвобождения Dox *in vitro* и фармакокинетику, первоначально были оптимизированы методы анализа этих параметров, включая методы определения размера и распределения частиц по размерам, ζ -потенциала поверхности НЧ, морфологии НЧ, методы определения общего содержания полимера и Dox в НЧ, степени включения Dox в НЧ, содержания влаги в образцах НЧ, содержания остаточного ПВС. При разработке методов руководствовались международными требованиями для ЛФ, содержащих наноматериалы, и одобренными FDA и ЕМА протоколами анализа нанотехнологичных ЛС (US-NCL, EU-NCL).

Оптимизацию методов оценки физико-химических параметров разработанных наносомальных форм проводили с использованием репрезентативных серий двух типов PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA Resomer® 502H с концевыми кислотными группами и характеристической вязкостью 0,2 дл/г, Mw 10-12 кДа (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) при значениях pH внешней водной фазы 7,4 (PLGA-Dox/7,4) и 6,4 (PLGA-Dox/6,4). Молекула Dox имеет амфифильный характер, поэтому его растворимость в водной фазе зависит от значения pH. При снижении pH от нейтрального значения 7,4 до 6,4 происходит увеличение доли катионов с протонированной аминогруппой ($pK_a=7,2-8,2$) и снижение доли цвиттер-ионов (pK_a аниона = 9,5) и основания Dox, что приводит к повышению его растворимости в воде и снижению растворимости в неполярных органических растворителях. В связи с этим предполагалось, что путем варьирования pH внешней водной фазы двойной эмульсии можно получить НЧ с разной степенью включения.

По результатам исследования, для определения размера наночастиц методом DLS оптимальными являются следующие условия: дисперсионная среда – вода Milli-Q, разведение – 0,2 мг/мл по PLGA, анализатор - Zetasizer Nano ZS. Средние значения гидродинамического диаметра НЧ PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 составлял 105 ± 12 нм (ζ -потенциал $-10,46 \pm 1,33$ мВ) и 137 ± 7 нм (ζ -потенциал $-6,90 \pm 2,98$ мВ). При этом до лиофилизации гидродинамический диаметр обоих типов НЧ составлял 90-100 нм, однако после лиофилизации в суспензии PLGA-Dox/6,4 НЧ появлялись микроагрегаты (3-5 мкм), фракция которых составляла не более 3 - 6%. Повышение концентрации криопротектора до 10% (масс.) при лиофилизации позволяет сохранить исходный размер PLGA-Dox/6,4 НЧ. Размеры НЧ, определенные с помощью

просвечивающей электронной микроскопии, были значительно меньше и составляли в среднем 50 ± 16 нм. Очевидно, что поскольку полученные наночастицы PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 имеют отрицательный ζ -потенциал поверхности, величина гидратной оболочки вносит существенный вклад в величину среднего размера, определенного методом DLS.

Общее содержание Dox в образцах PLGA-Dox НЧ оценивали с использованием метода спектрофотометрии (СФ) и метода ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. В случае ВЭЖХ предел количественного определения составлял 0,054 мкг/мл доксорубина. Содержание Dox в репрезентативной серии PLGA-Dox/7,4 НЧ составляло $1,06 \pm 0,13$ мг/флакон (СФ) или $1,11 \pm 0,67$ мг/мл (ВЭЖХ). Для оценки содержания примесей (доксорубинон, даунорубин гидрохлорид, даунорубинон, эпирубинин) в образцах PLGA-Dox НЧ была адаптирована методика ВЭЖХ анализа, описанная в USP: общее содержание примесей Dox в образцах PLGA-Dox/7,4 НЧ непосредственно после получения составляло 1,42%, а содержание единичных примесей не превышало 0,5% для каждой; содержание примесей в образцах не превышало 2,0% через 6 месяцев хранения при температуре $+5^\circ\text{C}$.

Для определения включения ЛВ в НЧ необходимо отделение его несвязанной (свободной) фракции. Для выявления оптимального метода отделения НЧ в данном исследовании сравнивали методы центрифугирования, ультрафильтрации и гель-фильтрации. Выявлено, что для определения степени включения Dox в НЧ наилучшим образом подходит метод центрифугирования с ускорением $48254 \times g$; в этом случае остаточное содержание PLGA в супернатанте не превышало 5% от исходного: НЧ PLGA-Dox/6,4, по сравнению с PLGA-Dox/7,4, отличались более низкой степенью включения (79,7 и 91,0%, соответственно). При использовании ультрафильтрации на фильтрах с диаметром пор 50 и 100 кДа сорбция Dox на мембране составляла $3,5 \pm 0,5\%$ и $1,9 \pm 0,5\%$, соответственно ($p < 0,05$). Использование фильтров с диаметром пор 10 и 30 кДа приводило к значительной сорбции Dox ($17,6 \pm 0,8\%$ и $7,7 \pm 0,7\%$, соответственно). При отделении свободного Dox методом гель-фильтрации происходит значительная десорбция Dox с поверхности и приповерхностного слоя НЧ, что приводит к занижению степени включения: при соотношении объема наносимой суспензии к объему колонки 1:23–35 о/о и 1:5,8–7 о/о рассчитанная степень включения Dox в PLGA-Dox/6,4 НЧ составляла ≈ 22 и 28%, соответственно; для PLGA-Dox/7,4 степень включения в обоих случаях составляла $\approx 74\%$. Тем не менее, метод гель-фильтрации в данном случае позволяет оценить количество Dox, который находится внутри НЧ или прочно с ней связан.

Общее содержание ПВС (9–10 кДа, степень гидролиза 80%) в образцах лиофилизата НЧ контролировали путем разрушения НЧ посредством щелочного гидролиза с дальнейшим образованием комплекса синего цвета ПВС с I_2 в KI в присутствии борной кислоты. Концентрацию ПВС определяли СФ при длине волны 673 нм. Содержание ПВС в образцах PLGA-Dox НЧ коррелировало с содержанием PLGA: соотношение ПВС:PLGA (мг/мг) составляло 1:1,62 и 1:1,60 в образцах PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ, соответственно.

Для определения содержания воды в PLGA-Dox НЧ использовали термогравиметрический метод (ТГА), при этом потеря в массе при высушивании PLGA-Dox/7,4 НЧ составляла $1,39 \pm 0,21\%$, а PLGA-Dox/6,4 – $1,25 \pm 0,13\%$. Кроме того, содержание воды в образцах определяли методом кулонометрического титрования по К. Фишеру. Содержание воды в образцах PLGA-Dox/7,4 составляло $1,41 \pm 0,13\%$, PLGA-Dox/6,4 – $1,29 \pm 0,20\%$ ($n=3$) и, таким образом, не превышало $\approx 2\%$.

Перед проведением исследований *in vivo* поверхность НЧ модифицировали путем инкубации в 1% растворе P188 (Kolliphor® P188, BASF; ККМ 0,32%), ввиду чего был произведен количественный анализ сорбции P188 на поверхности НЧ. Выявлено, что нагрузка PLGA НЧ Dox способствует сорбции P188, при этом сорбция возрастает в интервале времени 1-24 ч. Через 30 мин инкубации сорбция P188 на поверхности PLGA-Dox/7,4 НЧ составляла $0,30 \pm 0,08$ мг/м², через 24 ч – $0,50 \pm 0,12$ мг/м²; сорбция на поверхности плацебо-НЧ была ниже, чем на нагруженных Dox НЧ: $0,14 \pm 0,09$ мг/м² (30 мин) и $0,30 \pm 0,08$ мг/м² (24 ч). Показано, что инкубация PLGA НЧ в 1% растворе P188 приводит к увеличению гидродинамического диаметра НЧ: средний размер PLGA-Dox/7,4 НЧ составлял 103 ± 1 нм (PDI $0,023 \pm 0,014$) в воде и 115 ± 1 нм (PDI $0,104 \pm 0,022$) в 1% растворе P188 (DLS).

Оптимизация методов изучения и подходов к математическому описанию кинетики высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ *in vitro* в модельные среды и плазму крови

Высвобождение ЛВ из НЧ на основе PLGA происходит в несколько этапов: вначале происходит десорбция ЛВ с поверхности НЧ в приемную среду («burst-effect»), затем ЛВ высвобождается за счет диффузии из полимерной матрицы, а в дальнейшем в результате ее деградации. В качестве методов отделения НЧ от свободного Dox при изучении кинетики высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ были рассмотрены центрифугирование и диализ. Физико-химические параметры «неотмытых» и отмытых от свободного Dox PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ, использованных при оптимизации метода, приведены в Табл. 1. При отделении свободной фракции Dox методом гель-фильтрации нагрузка Dox (%) особенно снизилась в случае PLGA-Dox/6,4, что подтверждает гипотезу о приповерхностном расположении Dox в НЧ.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики неотмытых и отмытых от свободного доксорубина PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ ($n=3$)

Образец НЧ	Размер, нм	PDI	ζ-потенциал, мВ	Степень включения доксорубина, %	Нагрузка доксорубина, %
PLGA-Dox/7,4	105 ± 12	$0,144 \pm 0,001$	$-10,46 \pm 1,33$	$91,0 \pm 0,7$	$9,1 \pm 0,3$
PLGA-Dox /6,4	137 ± 7	$0,301 \pm 0,069$	$-6,90 \pm 2,98$	$79,7 \pm 1,1$	$7,8 \pm 0,1$
PLGA-Dox/7,4(G-25)	109 ± 5	$0,135 \pm 0,006$	$-21,00 \pm 1,28$	$97,6 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,2$
PLGA-Dox/6,4(G-25)	144 ± 6	$0,244 \pm 0,014$	$-20,90 \pm 0,57$	$97,7 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,1$

PLGA-Dox/6,4 НЧ по сравнению с PLGA-Dox/7,4 отличались более высокой скоростью высвобождения Dox и величиной «burst-effect». Применение метода диализа лимитировано присутствием в профиле высвобождения «lag-фазы», обусловленной ограниченной диффузией Dox через мембрану: концентрация Dox в приемной среде в течение первых 6 ч была существенно ниже, чем при использовании метода центрифугирования (Рис. 1). В случае центрифугирования повышение ускорения до $48254 \times g$ позволяет достичь практически полного осаждения НЧ: содержание PLGA в супернатанте при этом составляло 10% с учетом 3-5% фракции растворимого мономера PLGA в образцах НЧ, что подтверждали путем определения содержания PLGA в супернатанте методом капиллярного зонального электрофореза.

При повышении температуры среды скорость высвобождения Dox из НЧ увеличивается. Использование 1% раствора P188 в качестве приемной среды позволяет избежать агрегации НЧ и выпадения осадка, что делает его оптимальной средой для оценки профиля высвобождения Dox из Dox-PLGA НЧ *in vitro*. При увеличении степени разведения от 1:5 до 1:25 повышалась не только величина «burst-effect», но и скорость высвобождения, особенно для PLGA-Dox/6,4. В кислой среде скорость высвобождения Dox из НЧ выше, чем в 1% растворе P188, при этом чем ниже pH среды высвобождения, тем меньше разница в профиле высвобождения для НЧ с разной степенью включения. Так, через 6 ч инкубации в 1% растворе P188 разница в количестве высвобожденного Dox из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 составляла 23%, в MES буфере при pH=6,5 – 15%, в натрий-ацетатном буфере при pH=4,5 – 7%. Кинетика высвобождения Dox из обоих типов НЧ адекватно описывается уравнением первого порядка ($\ln(1-M_t/M_\infty) = -K_1 \times t$), причем скорость высвобождения для PLGA-Dox/6,4 выше, чем для PLGA-Dox/7,4. Различия между группами в первой фазе высвобождения наиболее существенны при расчете по модели Корсмейера-Пеппаса ($M_t/M_\infty = K_{KP} \times t^n$).

Для изучения профиля высвобождения Dox из НЧ в плазме крови человека разработана методика количественного определения свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) Dox методом ВЭЖХ диодно-матричным детектированием, основанная на экстракции Dox при разрушении НЧ и осаждении белков плазмы смесью диметилсульфоксида и ацетонитрила (1:1) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Предел количественного определения Dox в плазме составлял 1,95 мкг/мл, диапазон линейности 2-100 мкг/мл, степень экстракции – 96-104%. Для PLGA-Dox/6,4, отличающихся значительной скоростью высвобождения на начальном этапе, при разработке методики выявлено увеличение доли (%) высвободившегося Dox от $55,39 \pm 1,78\%$ до $82,82 \pm 1,48\%$ с уменьшением начальной концентрации НЧ от 100 до 10 мкг/мл по Dox. В случае PLGA-Dox/7,4 содержание свободного Dox в плазме увеличилось с $48,28 \pm 0,48\%$ до $63,05 \pm 1,33\%$ в изученном диапазоне разведения НЧ. Центрифугирование плазмы с НЧ на с ускорением $15000 \times g$ приводит к завышению содержания свободного Dox в супернатанте в среднем на 10% за счет неполного осаждения НЧ, по сравнению с ускорением

$48254 \times g$. Если в среде 1% раствора P188 содержание свободного Dox для PLGA-Dox/6,4 в течение первых 6 часов инкубации на 20% выше, чем для PLGA-Dox /7,4, то в плазме различия составляют не более 10% и степень высвобождения выше, чем в модельных средах (Рис. 2).

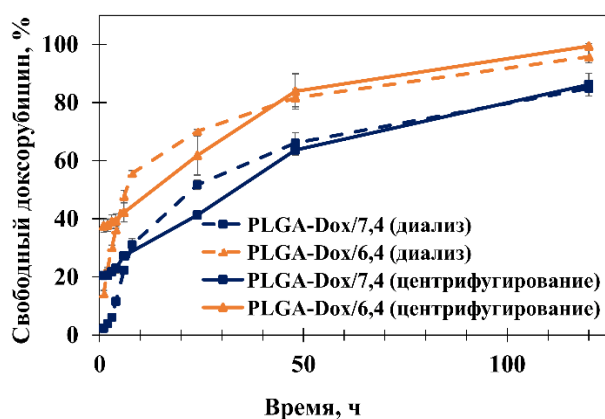


Рисунок 1 – Профиль высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в воде при отделении НЧ методом диализа (пунктирная линия) и в 1% растворе P188 при отделении НЧ центрифугированием с ускорением $48254 \times g$; температура инкубации $+37^{\circ}\text{C}$; разведение 1:25 ($n=3$)

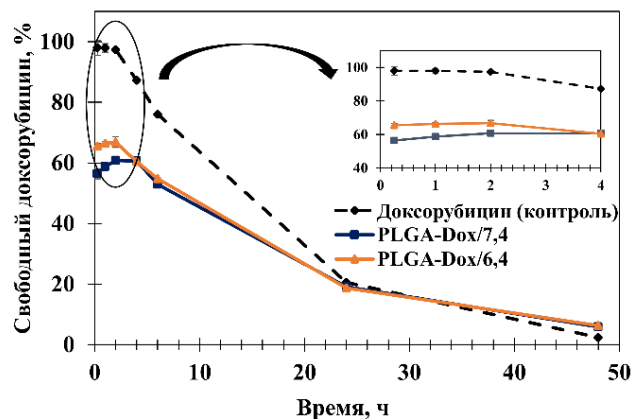


Рисунок 2 – Кинетика высвобождения доксорубина из PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ в плазме (контроль – субстанция доксорубина); $n=3$

Таким образом, оптимальным методом отделения НЧ при исследовании кинетики высвобождения Dox *in vitro* является центрифугирование ($48254 \times g$), а наиболее подходящей модельной средой – 1% водный раствор P188; разведение суспензии 1:25. Высвобождение доксорубина в плазме выше, чем в модельных средах.

Изучение факторов, влияющих на профиль высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ

В ходе проведенного исследования были выявлены факторы, оказывающие влияние на степень включения Dox (Табл. 2), и, соответственно, величину «burst-effect», а также скорость дальнейшего высвобождения в результате диффузии из матрицы и ее деградации (гидролитическая деградация). К данным факторам относятся:

- 1) кислотность внешней водной фазы двойной эмульсии (1% ПБС в PBS) при получении НЧ (pH 6,4 или 7,4): снижение pH внешней водной фазы эмульсии с 7,4 до 6,4 приводило к снижению степени включения Dox в НЧ (91,0% и 79,7%, соответственно) и увеличению первоначального высвобождения Dox из НЧ в модельную среду ~ на 17% (Рис. 1);
- 2) наличие/отсутствие концевых карбоксильных групп в молекулах PLGA (Resomer® 502H, Resomer® 502S или их смесь): электростатическое взаимодействие между аминогруппой Dox и карбоксильными группами на поверхности PLGA НЧ оказывает существенное влияние на эффективность связывания (нагрузки, %) Dox НЧ. При получении НЧ на основе Resomer® 502S степень включения Dox составляла 41%; $\approx 65\%$ Dox высвобождалось в приемную среду в течение первых часов. Введение сополимера PLGA с концевыми карбоксильными группами в соотношении 1:1 приводило к уменьшению величины «burst-эффекта» до 50% в 1-ый час после

начала эксперимента и до 20% при полной замене Resomer® 502S на Resomer® 502H (Рис. 3).

3) молекулярный вес PLGA (10-12 или 4-5 кДа, вязкость 0,2 и 0,18 дл/г, соответственно). Уменьшение (или увеличение) молекулярной массы PLGA сопровождается соответствующим увеличением (или уменьшением) количества концевых карбоксильных групп в матрице НЧ, и соответственно, увеличением кислотного числа полимера. В данном случае влияние на профиль высвобождения оказывают два фактора: 1) изменение молекулярной массы PLGA, приводящие в свою очередь к изменению скорости диффузии Dox из НЧ и к изменению скорости гидролиза матрицы; 2) количества концевых карбоксильных групп в PLGA, которые обуславливают возможность электростатического взаимодействия пары Dox – PLGA. Уменьшение молекулярной массы PLGA с 10,3 кДа до 4,7 кДа приводило к повышению степени включения Dox в НЧ (с 91,5% до 96,4%) за счет увеличения числа карбоксильных групп на единицу массы PLGA, но ускоряло гидролитическую деградацию НЧ и высвобождение Dox (Рис. 4 и 5). Высвобождение Dox из НЧ, полученных из PLGA с молекулярной массой 10,3 кДа, через 1 час и 24 часа составляло 21,3% и 41,6%, соответственно, в то время как для НЧ, полученных из PLGA с молекулярной массой 4,7 кДа, через 1 и 24 часа высвободилось 16,7% и 64,4%, соответственно. Низкая молекулярная масса PLGA коррелировала с низкой температурой стеклования T_g (34,7 °C vs 42,1°C), большими значениями кислотного числа (21,4 vs 11,8) и остаточного содержания мономера (2,1% vs 0,3%), соответственно.

Таблица 2 – Физико-химические параметры PLGA-Dox НЧ с различным профилем высвобождения Dox (средние значения $\pm$ SD); n=3

Характеристика полимера	pH	ЛВ	Степень включения доксорубина, %	Свободный Dox (1 час), %	Средний размер, нм	PDI	ζ -потенциал, мВ
Resomer® 502H	7,4	Dox	91,0 $\pm$ 0,7	20,4 $\pm$ 0,4	105 $\pm$ 12	0,144 $\pm$ 0,001	-10,5 $\pm$ 1,3
Resomer® 502H	6,4	Dox	79,7 $\pm$ 1,1	37,5 $\pm$ 2,2	137 $\pm$ 7	0,301 $\pm$ 0,069	-6,9 $\pm$ 3,0
Lactel® B6013-1G	7,4	Dox	96,7 $\pm$ 1,6	13,1 $\pm$ 4,0	89 $\pm$ 1	0,142 $\pm$ 0,025	-13,7 $\pm$ 0,3
Смесь Resomer® 502H и 502S (1:1)	7,4	Dox	64,7 $\pm$ 0,5	49,2 $\pm$ 5,6	119 $\pm$ 2	0,180 $\pm$ 0,033	-4,5 $\pm$ 1,9
Resomer® 502S	7,4	Dox	41,0 $\pm$ 2,7	65,6 $\pm$ 3,3	134 $\pm$ 1	0,165 $\pm$ 0,013	-3,7 $\pm$ 0,3
Lactel® B6013-2P + олигомер 20:1, отмытые	7,4	Dox	83,9 $\pm$ 2,8	23,3 $\pm$ 0,8	122 $\pm$ 1	0,084 $\pm$ 0,027	-24,2 $\pm$ 1,4
Resomer® 502H	7,4	Dox-AOT*	87,0 $\pm$ 0,8	20,3 $\pm$ 0,6	76 $\pm$ 1	0,140 $\pm$ 0,012	-17,0 $\pm$ 1,8

* Dox-AOT- гидрофобный комплекс доксорубина (Dox) с диоктилсульфосукцинатом натрия (AOT)

Были рассмотрены подходы к получению НЧ с медленным высвобождением Dox. Использование PLGA с вязкостью 0,66 дл/г вызывало значительное снижение степени включения Dox в НЧ (40%), при замене 20% высокомолекулярного полимера в составе полимерной композиции на низкомолекулярный олигомер (700-800 Да) степень включения повысилась до $\approx$ 84%, однако скорость высвобождения DOX в модельную среду осталась

высокой (42% в течение 24 часов). В то же время, НЧ, полученные на основе Resomer® 502H методом «двойных эмульсий» с АОТ в качестве противоиона, отличались высокой степенью включения (87%) и низкой скоростью высвобождения Dox (25% в течение 24 часов) (Рис. 6).

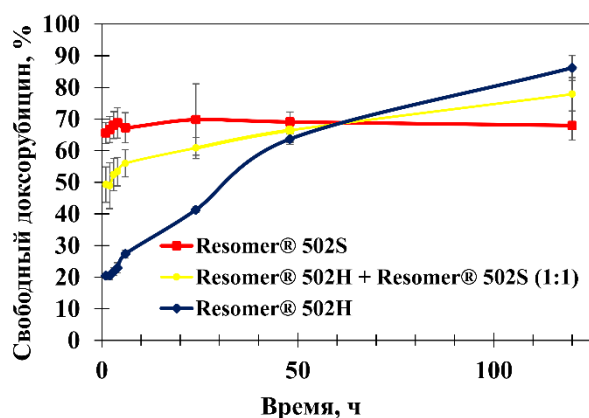


Рисунок 3 – Профиль высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 H, PLGA с концевыми сложноэфирными группами Resomer® 502 S, а также их смеси 1:1; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ($48254 \times g$, +5 °С); $n=3$

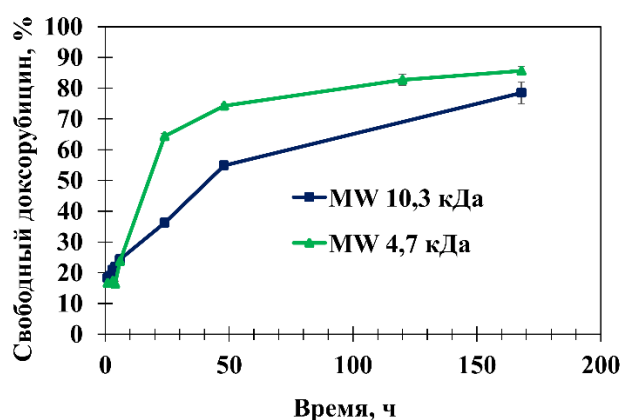


Рисунок 4 – Профиль высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 H (MW 10,3 кДа) и PLGA с низкой молекулярной массой Lactel® B6013-1G (MW 4,7 кДа); разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ($48254 \times g$, +5 °С); репрезентативные серии; $n=3$

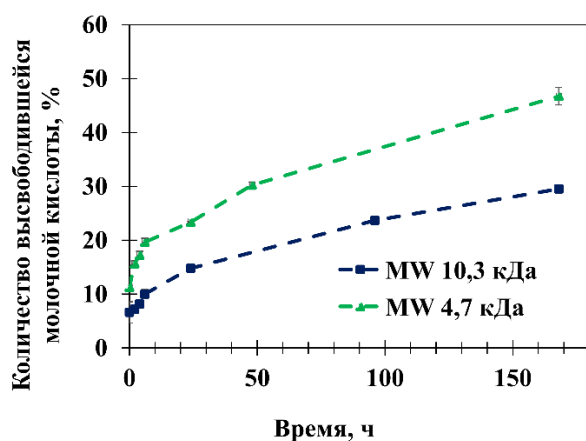


Рисунок 5 – Профиль гидролитической деградации PLGA-Dox НЧ на основе PLGA с концевыми карбоксильными группами Resomer® 502 H (MW 10,3 кДа) и PLGA с низкой молекулярной массой Lactel® B6013-1G (MW 4,7 кДа); среда – PBS (pH=7,4)

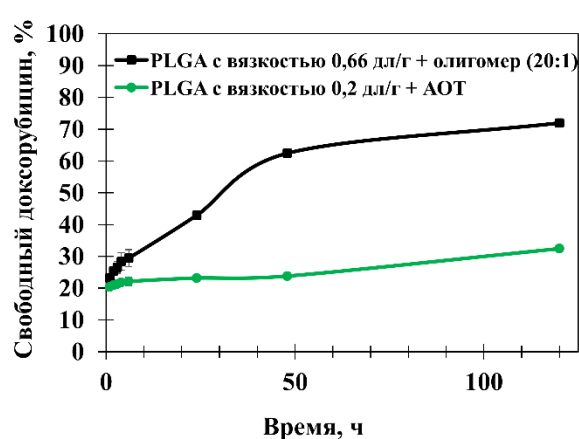


Рисунок 6 – Профиль высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ, полученных на основе PLGA с высокой вязкостью (0,66 дЛ/г) с добавлением низкомолекулярного олигомера ($\approx 700-800$ Да), и НЧ на основе Resomer® 502 H, содержащих комплекс доксорубин-АОТ; разведение 1:25, температура инкубации +37 °С; метод отделения НЧ – центрифугирование ($48254 \times g$, +5 °С); $n=3$

Дальнейшие исследования влияния профиля высвобождения на фармакокинетику, а также распределение между плазмой и эритроцитами крови проводили для наночастиц,

полученных при pH=7,4 (PLGA-Dox/7,4) и pH=6,4 (PLGA-Dox/6,4).

Изучение взаимодействия PLGA-Dox НЧ с эритроцитами крови человека

Подтверждено отсутствие гемолитических свойств наносомальной формы Dox: PLGA-Dox/7,4 НЧ не вызывали существенного гемолиза эритроцитов при инкубации в течение 2 ч при +37 °С в диапазоне концентраций $\approx 0,2-200$ мкг/мл по Dox; гемолиз эритроцитов составлял всего $1,26 \pm 0,4\%$ при максимальной концентрации НЧ в исследуемом диапазоне (200 мкг/мл).

Параметры распределения между компартментами крови, а именно отношение концентрации Dox в крови к его концентрации в плазме ($K_{\text{Blood/Plasma}}$) и отношение концентрации Dox в эритроцитах к его концентрации в плазме ($K_{\text{RBC/Plasma}}$) были рассчитаны для общего (свободный + связанный с НЧ) Dox в сравнении с Dox в свободном виде (субстанция, контроль – Dox) в диапазоне 10-100 мкг/мл по Dox через 5, 15 и 30 мин инкубации в цельной крови. Исследование проведено для наносомальных форм PLGA-Dox/7,4 и форм PLGA-Dox/6,4, обладающих различной степенью включения Dox, а также НЧ, отмытых от свободной фракции Dox – PLGA-Dox/7,4(G-25) PLGA-Dox/6,4(G-25). Результаты приведены в Табл. 3.

Таблица 3 – Значение коэффициентов распределения Dox между плазмой и эритроцитами крови в зависимости от общей концентрации Dox и времени инкубации в цельной крови человека; средние значения $\pm$ SD, n=3

Параметры связывания			Время инкубации					
			5 мин		15 мин		30 мин	
			$K_{\text{RBC/Plasma}}$	$K_{\text{Blood/Plasma}}$	$K_{\text{RBC/Plasma}}$	$K_{\text{Blood/Plasma}}$	$K_{\text{RBC/Plasma}}$	$K_{\text{Blood/Plasma}}$
Концентрация доксорубина, мкг/мл	10	Dox	$0,83 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,03$	$2,15 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,02$	$2,25 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,03$
		PLGA-Dox/6,4	$0,84 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,01$	$1,94 \pm 0,04$	$1,38 \pm 0,04$	$1,83 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,05$
		PLGA-Dox/7,4	$0,72 \pm 0,03$	$0,89 \pm 0,03$	$1,42 \pm 0,03$	$1,17 \pm 0,03$	$1,50 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,02$
	50	Dox	$0,76 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,04$	$2,42 \pm 0,05$	$1,57 \pm 0,05$	$2,30 \pm 0,02$	$1,52 \pm 0,02$
		PLGA-Dox/6,4	$0,75 \pm 0,01$	$0,90 \pm 0,01$	$2,10 \pm 0,03$	$1,44 \pm 0,03$	$2,00 \pm 0,04$	$1,4 \pm 0,04$
		PLGA-Dox/7,4	$0,69 \pm 0,03$	$0,88 \pm 0,03$	$1,28 \pm 0,04$	$1,11 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,01$
	100	Dox	$0,73 \pm 0,06$	$0,89 \pm 0,06$	$2,53 \pm 0,03$	$1,61 \pm 0,03$	$2,73 \pm 0,03$	$1,69 \pm 0,03$
		PLGA-Dox/6,4	$0,70 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,01$	$2,07 \pm 0,05$	$1,43 \pm 0,05$	$1,98 \pm 0,02$	$1,39 \pm 0,02$
		PLGA-Dox/7,4	$0,68 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$	$1,42 \pm 0,03$	$1,17 \pm 0,03$	$1,34 \pm 0,06$	$1,14 \pm 0,06$

Рассчитанное на основании значений $K_{\text{Blood/Plasma}}$ общее количество Dox, связанного с эритроцитами после 5 минут инкубации, для всех наносомальных форм не отличалось от контроля (Dox) и составлял $33 \pm 2\%$ ($p > 0,05$) во всем диапазоне концентраций. Равновесная степень связывания (через 15 мин инкубации) составляла 58-63% для свободного Dox, 57-58% для Dox-PLGA/6,4; при этом для формы PLGA-Dox/7,4, отличающейся большей степенью включения Dox, в тех же условиях отмечено меньшее связывание с эритроцитами (46-49%), в этом случае в плазме остается больше Dox ($p < 0,05$). НЧ Dox-PLGA/6,4(G-25), характеризующиеся минимальной нагрузкой Dox, обладали самой низкой равновесной степенью связывания с эритроцитами крови ($\sim 34\%$). Таким образом, равновесные

коэффициенты распределения Dox между плазмой и эритроцитами зависели от степени включения и нагрузки Dox в PLGA-Dox НЧ.

Исследование фармакокинетики наносомальных форм доксорубина с различным профилем высвобождения при однократном введении крысам

Была изучена взаимосвязь между профилем высвобождения Dox из PLGA-Dox *in vitro* и фармакокинетическими параметрами для свободного и общего Dox в плазме крови крыс при внутривенном введении наносомальных форм в 1% растворе P188 в дозе 5 мг/кг по сравнению с субстанцией Dox. Для этой цели была разработана и валидирована методика количественного определения (ВЭЖХ со спектрофлуориметрическим детектированием) свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) Dox в образцах крови и плазмы крыс. В плазме предел количественного определения составлял 0,007 мкг/мл; коэффициент вариации (RSD, %) точности был менее 20%, а степень экстракции Dox более 95%. Типичная хроматограмма пробы плазмы представлена на Рис. 7.

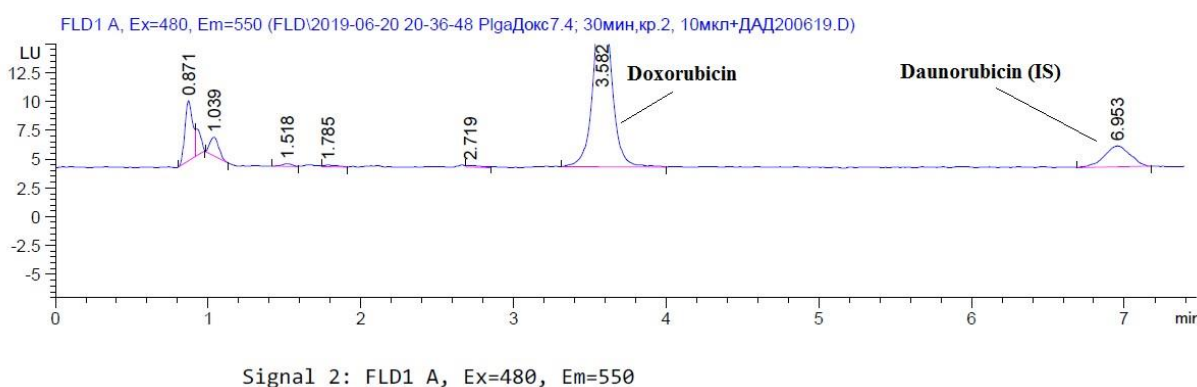


Рисунок 7 – Хроматограмма пробы плазмы крови через 30 мин после введения PLGA-Dox/7,4 НЧ в дозе 5 мг/кг; время удерживания доксорубина – 3,582 мин, время удерживания даунорубина (внутренний стандарт) – 6,953 мин

Как было отмечено ранее, полученные при более кислом pH PLGA-Dox/6,4 НЧ по сравнению с PLGA-Dox/7,4 отличались более низкой степенью включения (~80% vs 91%, соответственно) и более высокой скоростью высвобождения Dox *in vitro* в 1% растворе P188 (~38% vs 20% через 1 ч, соответственно) и плазме (~66% vs 58% через 1 ч, соответственно). Как и ожидалось, включение Dox в состав НЧ приводило к существенному увеличению концентрации общего Dox в плазме крови в течение первых 30 минут после введения по сравнению с субстанцией Dox; разница наиболее существенна в первые минуты после введения. Концентрации свободного (несвязанного с НЧ) Dox также выше после введения наносомальных форм по сравнению с субстанцией. По сравнению с субстанцией НЧ отличались более высокими значениями AUC и, особенно, AUC_{0→1h}, низким значением клиренса (Cl) и низким объемом распределения (V), что свидетельствует о влиянии ЛФ на биораспределение Dox (Табл. 4).

Таблица 4 – Фармакокинетические параметры общего и свободного доксорубина в плазме крови крыс после внутривенного введения наносомальных форм в дозе 5 мг/кг в сравнении с субстанцией доксорубина

Параметр	Доксорубин	PLGA- Dox/7,4 _{Total}	PLGA- Dox/7,4 _{Free}	PLGA- Dox/6,4 _{Total}	PLGA- Dox/6,4 _{Free}
	Среднее значение ± SD (RSD, %)				
AUC (нг×ч/мл)	1300,9 ± 135,8 (10,4%)	4603,8 ± 1247,1 (27,1%)	2064,8 ± 273,9 (13,3%)	4434,1 ± 1017,8 (23,0%)	2995,3 ± 574,8 (19,2%)
AUC _{0→1h} (нг×ч/мл)	395,3 ± 94,2 (23,8%)	3589,5 ± 1298,5 36,2%	1051,6 ± 244,8 (23,3%)	2999,1 ± 905,3 (30,2%)	1647,4 ± 500,2 (30,4%)
C _{max} (нг/мл)	1265,4 ± 293,2 (23,2%)	12441,0 ± 4276,8 (34,4%)	3558,2 ± 945,3 (26,6%)	10366,8 ± 2695,4 (26,0%)	5682,8 ± 1489,5 (26,2%)
Cl (мл/ч)	662,7 ± 68,2 (10,3%)	219,5 ± 52,5 (23,9%)	414,4 ± 45,6 (11,0%)	216,2 ± 52,4 (24,2%)	309,3 ± 51,2 (16,6%)
V (мл)	13498,2 ± 2374,4 (17,6%)	1576,8 ± 789,0 (50,0%)	8396,6 ± 2520,0 (30,0%)	2506,4 ± 1242,1 (49,6%)	4224,4 ± 1262,6 (29,9%)

Компартментный анализ профилей «концентрация в плазме - время» был проведен с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели PBNB. PBNB модель состоит из трех основных отсеков (Рис. 8). «Отсек носителя» – связанная с носителем фракция ЛВ, характеризующаяся объемом распределения V_{DC} , который, как предполагалось, в нашем случае соответствует объему плазмы крови крыс; процесс выведения носителя из кровотока характеризуется периодом полувыведения носителя ($t_{1/2}$) и во многом отвечает за величину накопленной фракции ЛВ (m_{accum}). Предполагалось, что процесс высвобождения ЛВ из «отсека носителя» в отсек, представляющий собой высвобожденную фракцию ЛВ, соответствует модели 3RPT (*англ.* 3-parametric reciprocal powered time model):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{t^b}{t^b + m} * c$$

где M_t – количество ЛВ, высвобождаемое за определенное время (t); M_∞ – общее количество ЛВ; параметр m представляет собой время, за которое было достигнуто 50% фазы плато, параметр b определяет форму профиля, c – высвобожденную долю ЛВ в фазе плато. Распределение и элиминацию свободного (не связанного с НЧ) Dox оценивали с использованием фармакокинетических параметров, наблюдаемых для свободного ЛВ, включая k_F , k_{12} , k_{21} и V_{DF} . Все параметры были ограничены определенными диапазонами, причем было проведено два варианта моделирования с разными диапазонами значений периода полувыведения носителя ($t_{1/2}$) (I и II). Второй диапазон для периода полувыведения носителя (II), а также фармакокинетические параметры свободного Dox были получены путем фармакокинетического анализа (Табл. 5). Модель PBNB определила точный объем распределения носителя (V_{DC}), параметры высвобождения Dox *in vivo* – m , b и c , а также период полувыведения носителя ($t_{1/2}$) из кривой зависимости общей концентрации в плазме от времени (Табл. 6).

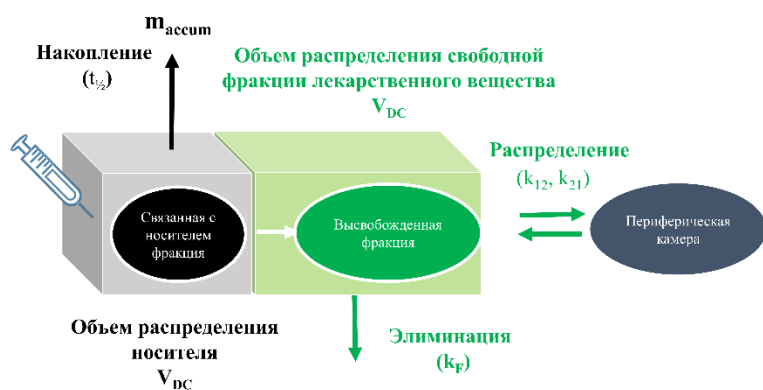


Рисунок 8 – Схематическое изображение модели PBNB. Модель состоит из трех основных отсеков, включая связанную с носителем (серый цвет) и высвобожденную фракцию ЛВ (зеленый цвет), а также один периферический отсек (синий цвет), куда происходит распределение свободной фракции доксорубина

Таблица 5 – Диапазоны параметров, заданные для анализа данных с использованием PBNB модели

Параметр	Диапазон значений параметра
V_{DC} , л	$8,325 \pm 4,03$ (ω : 0,5)
$t_{1/2}^I$, ч	$0,5 \pm 0,71$ (ω : 0,5)
$t_{1/2}^{II}$, ч	$0,364 \pm 0,017$ h (ω : 0,5)
k_F , ч ⁻¹	$1,074 \pm 0,46$ (ω : 0,5)
k_{12} , ч ⁻¹	$13,77 \pm 2,62$ (ω : 0,5)
k_{21} , ч ⁻¹	$0,68 \pm 0,21$ (ω : 0,5)
V_{DF} , мл	$787,69 \pm 293,13$ (ω : 0,5)

Таблица 6 – Фармакокинетические параметры наносомальных форм доксорубина, рассчитанные с использованием PBNB модели

Лекарственная форма	Заданный диапазон значений $t_{1/2}$ (ч)	0,5 ± 0,71 (ω : 0,5)	0,364 ± 0,017 (ω : 0,5)
	Параметр	Среднее значение ± SD	
PLGA-Dox/7,4 _{Total}	$t_{1/2}$ (ч)	$0,263 \pm 0,000$	$0,374 \pm 0,001$
	m	$0,499 \pm 0,000$	$0,468 \pm 0,000$
	b	$0,845 \pm 0,000$	$0,832 \pm 0,005$
	c	$8,023 \pm 0,000$	$9,052 \pm 0,004$
	V_{DC} (мл)	$15,638 \pm 0,006$	$11,935 \pm 0,050$
	F_{target} (%)	$12,790 \pm 0,012$	$7,415 \pm 0,110$
PLGA-Dox/6,4 _{Total}	$t_{1/2}$ (ч)	$0,727 \pm 0,002$	$0,395 \pm 0,004$
	m	$0,382 \pm 0,012$	$0,460 \pm 0,008$
	b	$0,986 \pm 0,000$	$0,880 \pm 0,002$
	c	$10,788 \pm 0,002$	$11,227 \pm 0,031$
	V_{DC} (мл)	$13,560 \pm 0,003$	$10,521 \pm 0,051$
	F_{target} (%)	$3,910 \pm 0,107$	$5,899 \pm 0,106$

С помощью PBNB анализа был смоделирован профиль высвобождения Dox из PLGA-Dox НЧ *in vivo*; моделирование проведено для (I) заданного диапазона $t_{1/2}$ (Рис. 9). Для формы PLGA-Dox/7,4 НЧ была отмечена более низкая скорость высвобождения Dox *in vivo*, что согласуется с ее более высокой нацеливающей способностью (F_{target} , %) по сравнению с PLGA-Dox/6,4 (12,79% и 3,91%, соответственно).

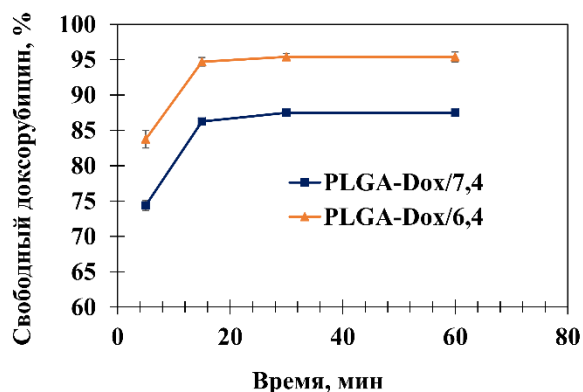


Рисунок 9 – Моделирование высвобождения Dox из PLGA-Dox/7,4 (синий) и PLGA-Dox/6,4 (оранжевый) *in vivo* с использованием модели PBNB

При сужении интервалов заданных параметров $t_{1/2}$ до $0,364 \pm 0,017$ ч (ω : 0,5) определенные моделью значения объема распределения носителя (V_{DC}), периода полувыведения ($t_{1/2}$) и нацеливающей способности (F_{target}) были гораздо более близкими для PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4 НЧ. Тем не менее, модель подтверждает небольшое различие в нацеливающей способности между типами НЧ (7,41% и 5,90%, соответственно), обеспечивая больше доказательств положительного влияния более высокого значения pH на высвобождение Dox *in vivo*. Следовательно, PLGA-Dox/7,4 НЧ имеют более высокий потенциал для успешной доставки Dox в целевые ткани и органы, в нашем случае – ткани мозга после преодоления ГЭБ. Благодаря более сильному взаимодействию Dox с матрицей НЧ, наносомальная форма PLGA-Dox/7,4 больше подходит для адресной доставки Dox. Тем не менее, скорость высвобождения Dox из НЧ и элиминации НЧ из кровотока очень высока и требует более детального анализа вклада высвобождения ЛВ и накопления НЧ в тканях в целевую доставку Dox в мозг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования были получены наносомальные формы Dox на основе PLGA с различным профилем высвобождения Dox и установлена значимость влияния отдельных параметров наносомальной формы (средний размер, PDI, заряд поверхности, степень включения Dox) на профиль высвобождения Dox *in vitro* в модельные среды и плазму. Установлена зависимость фармакокинетических параметров наносомальных форм Dox от скорости высвобождения Dox *in vitro* и исследована возможность прогнозирования профиля высвобождения *in vivo* на основании фармакокинетических параметров, рассчитанных с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели.

ВЫВОДЫ

1. Получены наносомальные формы доксорубина на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот с различным профилем высвобождения доксорубина (PLGA-Dox).
2. Выявлены факторы, влияющие на физико-химические параметры наносомальных форм и профиль высвобождения Dox: pH внешней водной фазы эмульсии, молекулярный вес PLGA, наличие и количество концевых карбоксильных групп PLGA, введение противоиона для получения гидрофобного комплекса с доксорубином. Установлены основные параметры, определяющие качество разработанных форм PLGA-Dox: средний размер, PDI и ζ -потенциал поверхности НЧ, содержание Dox и наличие его примесей, содержание PLGA, вспомогательных веществ, остаточная влажность; профиль высвобождения Dox в модельные среды и профиль гидролитической деградации НЧ. Показано, что оптимальным методом отделения НЧ для определения степени включения Dox в PLGA НЧ является центрифугирование при ускорении $48254 \times g$ и ультрафильтрация при использовании фильтров с размером пор 50 и 100 кДа (NMWL). Оптимальным методом отделения НЧ при исследовании

кинетики высвобождения Dox *in vitro* также является центрифугирование, а наиболее подходящей модельной средой – 1% раствор полоксамера 188; разведение суспензии в отношении 1:25 оптимально для оценки влияния степени включения на величину «burst-effect». Величина первоначального высвобождения Dox в плазме выше, чем в модельных средах.

3. Установлено, что наносомальная форма доксорубина не оказывает гемолитическое действие. Определены параметры распределения Dox в составе наносомальной формы между плазмой и эритроцитами крови в эксперименте *in vitro*. Установлено, что включенный в наночастицы PLGA-Dox доксорубин в концентрации 10–100 мкг/мл связывается с эритроцитами крови человека в меньшей степени, чем свободный доксорубин.

4. Для изучения профиля высвобождения Dox из НЧ в плазме крови человека *in vitro* разработана методика количественного определения (ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием) свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) Dox в плазме, основанная на экстракции Dox при разрушении НЧ и осаждении белков плазмы смесью диметилсульфоксида и ацетонитрила (1:1) с добавлением 0,1% муравьиной кислоты. Предел количественного определения Dox в плазме составлял 1,95 мкг/мл, диапазон линейности 2–100 мкг/мл, степень экстракции – 96–104%. Для изучения фармакокинетики наносомальных форм Dox разработана и валидирована методика количественного определения (ВЭЖХ со спектрофлуориметрическим детектированием) свободного и общего (свободный и связанный с PLGA НЧ) Dox в образцах крови и плазмы крыс. В плазме предел количественного определения составлял 0,007 мкг/мл; коэффициент вариации (RSD, %) точности был менее 20%, а степень экстракции Dox более 95%.

5. Определены фармакокинетические параметры двух наносомальных форм доксорубина (PLGA-Dox/7,4 и PLGA-Dox/6,4) в плазме крыс при однократном внутривенном введении в дозе 5 мг/кг в 1% растворе полоксамера 188. Так, для общего доксорубина в случае PLGA-Dox/7,4 НЧ AUC составлял $4603,8 \pm 1247,1$ нг×ч/мл, $AUC_{0 \rightarrow 1h} = 3589,5 \pm 1298,5$ нг×ч/мл, C_{max} $12441,0 \pm 4276,8$ нг/мл, Cl $219,5 \pm 92,5$ мл/ч, V – $1576,8 \pm 789,0$ мл; в случае PLGA-Dox/6,4 НЧ AUC составлял $4434,1 \pm 1017,8$ нг×ч/мл, $AUC_{0 \rightarrow 1h} = 2999,1 \pm 905,1$ нг×ч/мл, C_{max} $10366,8 \pm 2695,4$ нг/мл, Cl $216,2 \pm 2,4$ мл/ч, V – $2506,4 \pm 1242,1$ мл. Связывание доксорубина с НЧ значительно увеличивало его общую концентрацию в плазме в течение первых 30 минут после введения, уменьшало объем распределения и клиренс и, соответственно, приводило к увеличению AUC (особенно $AUC_{0 \rightarrow 1h}$), по сравнению с введением доксорубина в свободной форме. По сравнению с PLGA-Dox/7,4 форма PLGA-Dox/6,4 отличалась более высоким значением C_{max} : $3558,2 \pm 945,3$ и 5682 ± 1489 нг/мл, соответственно.

6. При анализе фармакокинетических данных с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели выявлена большая нацеливающая способность PLGA-Dox/7,4 (12,79%) НЧ по сравнению с PLGA-Dox/6,4 НЧ (3,91%), которая коррелировала с меньшей спрогнозированной скоростью высвобождения *in vivo*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список публикаций в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus

1. **Kovshova T.** Exploring the interplay between drug release and targeting of lipid-like polymer nanoparticles loaded with doxorubicin / **T. Kovshova**, N. Osipova, A. Alekseeva, J. Malinovskaya, A. Belov, A. Budko, G. Pavlova, O. Maksimenko, S. Nagpal, S. Braner, H. Modh, V. Balabanyan, M. G. Wacker, S. Gelperina // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №. 4 – 831. **DOI:** 10.3390/molecules26040831. **IF 3,267.**
2. Kumskova N. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release / N. Kumskova, Y. Ermolenko, N. Osipova, A. Semyonkin, N. Kildeeva, M. Gorshkova, A. Kovalskii, **T. Kovshova**, V. Tarasov, J. Kreuter, O. Maksimenko, S. Gelperina // *Journal of Microencapsulation*. – 2020. – Vol. 37. – №. 3. – P. 283-295. **DOI:** 10.1080/02652048.2020.1729885. **IF 2,050.**
3. Ermolenko Yu. V. Role of hydrolytic degradation of polylactide drug carriers in developing micro- and nanoscale polylactide-based drug dosage forms / Yu. V. Ermolenko, A.S. Semyonkin, Yu V. Ulianova, **T.S. Kovshova**, O.O. Maksimenko, S.E. Gelperina // *Russian Chemical Bulletin*. – 2020. – Vol. 69. – №. 8. – P. 1416-1427. **DOI:** 10.1007/s11172-020-2918-0. **IF 1,059.**
4. **Kovshova T. S.** Optimization of methods for determination of the encapsulation efficiency of doxorubicin in the nanoparticles based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) / **T. S. Kovshova**, N. S. Osipova, A. S. Fortuna, Yu. V. Ermolenko, O. O. Maksimenko, V. Yu. Balabanyan, S. E. Gelperina // *Drug development & registration*. – 2020. – Vol. 9. – №. 2. – P. 113-118. **DOI:** 10.33380/2305-2066-2020-9-2-113-118.

Список публикаций в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки РФ

1. Малиновская Ю.А. Цитотоксичность и гемосовместимость PLGA НЧ, нагруженных доксорубицином / Ю.А. Малиновская, Е.И. Коваленко, **Т.С. Ковшова**, Н.С. Осипова, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2020. – Т. 19. – №. 1. – С. 71-80. **DOI:** 10.17650/1726-9784-2019-19-1-71-80.
2. **Ковшова Т.С.** Изучение и математическое описание кинетики высвобождения доксорубина из PLGA наночастиц *in vitro* / **Т.С. Ковшова**, Н.С. Осипова, А.В. Белов, Е.В. Шипуло, Ю.В. Ермоленко, Ю.А. Малиновская, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина // *Биофармацевтический Журнал*. — 2020. — Т. 12. — № 4. — С. 27–37. **DOI:** 10.30906/2073-8099-2020-12-4-27-42.
3. **Ковшова Т.С.** Влияние параметров наносомальной формы доксорубина на основе PLGA на распределение между плазмой и эритроцитами крови человека / **Т.С. Ковшова**, Н.С. Осипова, А.В. Белов, О.О. Максименко, В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2020. – Т. 23. – №. 8. – С. 11–18. **DOI:** 10.29296/25877313-2020-08-02.

Список публикаций в сборниках материалов и тезисов конференций

1. **Ковшова Т.С.** Осипова Н.С., Белов А.В., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю. Изучение *in vitro* профиля высвобождения доксорубина из наночастиц на основе PLGA в модельные среды и плазму крови // *Гармонизация подходов к фармацевтической разработке. Сборник тезисов II Международной научно-практической конференции. Российский университет дружбы народов*. — Москва, Российский университет дружбы народов (РУДН), 2019. — С. 153–156. **ISBN 978-5-209-09704-4.**
2. **Ковшова Т.С.**, Шипуло Е.В., Осипова Н.С., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю. Изучение сорбции полоксамера 188 на поверхности наночастиц на основе PLGA, нагруженных доксорубицином // *Гармонизация подходов к фармацевтической разработке. Сборник*

тезисов II Международной научно-практической конференции. Российский университет дружбы народов. — Москва, Российский университет дружбы народов (РУДН), 2019. — С. 150–153. **ISBN 978-5-209-09704-4.**

3. **Ковшова Т. С.** Оптимизация методов изучения физико-химических параметров PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином // Материалы Международного молодежного научного форума ЛОМОНОСОВ-2020 [Электронный ресурс] / отв. ред. И. А. Алешковский, А. В. Андриянов, Е. А. Антипов. — М.: МАКС Пресс, 2020. — Режим доступа: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2020/index.htm. — 2020. **ISBN 978-5-317-06417-4.**

4. **Ковшова Т.С.,** Осипова Н.С., Белов А.В., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю. Изучение распределения наносомальной формы доксорубицина на основе PLGA между плазмой и форменными элементами крови // Сборник тезисов докладов Пятой Междисциплинарной конференции Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии. — Перо Москва, 2019. — С. 43–43. **ISBN 978-5-00150-465-8.**

5. **Kovshova T.,** Osipova N., Alekseeva A., Belov A., Budko A., Malinovskaya J., Maksimenko O., Modh H., Braner S., Wacker M.G., Balabanyan V., Gelperina S. Pharmacokinetics Of Doxorubicin-loaded Nanoparticles Based On Poly(lactic-co-glycolic Acid) In Rats: Influence Of Drug Release Rate // 47th (Virtual) Annual Meeting of the Controlled Release Society «2020 Vision for Global Impact» - U.S.A. — June 28th – July 1st, 2020.

6. **Kovshova T.,** Osipova N., Alekseeva A., Pavlova G., Belov A., Budko A., Maksimenko O., Balabanyan V., Gelperina S. Biopharmaceutical analysis of the doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different release profiles of doxorubicin // 11th International Conference «Biomaterials and Nano-biomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» (BIONANOTOX 2020) – (Virtual) Greece. – 7-8 September, 2020.

7. **Kovshova T.,** Osipova N., Belov A., Maksimenko O., Balabanyan V., Gelperina S. Optimization of the method for evaluation of doxorubicin release from PLGA nanoparticles into model media and blood plasma// 11th International Conference «Biomaterials and Nano-biomaterials: Recent Advances Safety – Toxicology and Ecology Issues» (BIONANOTOX-2020) – (Virtual) Greece. – 7-8 September, 2020.

8. **Ковшова Т. С.,** Осипова Н. С., Шипуло Е. В., Максименко О.О., Гельперина С.Э., Балабаньян В.Ю. Технологические способы модификации кинетики высвобождения доксорубицина из наночастиц на основе PLGA *in vitro*// Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии. — Москва: Москва, 2020. — С. 47–47. **ISBN 978-5-00171-388-3.**

9. **Ковшова Т. С.,** Осипова Н.С., Алексеева А.И., Белов А.В., Малиновская Ю.А., Будько А.П., Максименко О.О., Нагпал С., Бранер С., Модх Х., Балабаньян В.Ю., Вакер М.Г., Гельперина С.Э. Анализ фармакокинетики наносомальной формы доксорубицина на основе PLGA с использованием физиологически обоснованной биофармацевтической модели // Гармонизация подходов к фармацевтической разработке: сборник тезисов III Международной научно-практической конференции. — Москва: Москва, 2020. — С. 206–209. **ISBN 978-5-209-10338-7.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

DLS	– метод динамического светорассеяния	ζ-потенциал	– поверхностный потенциал наночастиц
Dox	– доксорубицин		
MW	– молекулярный вес полимера	ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
PBNB	– Physiologically-based nanocarrier biopharmaceutics model)	ГЭБ	– гематоэнцефалический барьер
PDI	– индекс полидисперсности	ЛВ	– лекарственное вещество
P188	– полуксамер 188	ЛФ	– лекарственная форма
PLGA	– сополимер молочной и гликолевой кислот	НЧ	– наночастицы
SD	– стандартное отклонение (standard deviation)	ПВС	– поливиниловый спирт