УДК 663

Т. К. Бронич

ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОГЕЛИ: НОВЫЕ БИОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ ОТ РАКА

Ключевые слова: Блок сополимеры, ионные наногели, доставка лекарств, фолатная направленная доставка, рак яичников.

В данной статье описывается новый тип ионных наногелей с регулируемым пространственным распределением полимерных цепочек и обсуждаются возможности применения данных наногелей как носителей при доставке противораковых лекарств.Ионные наногели показали свою перспективность и универсальность в качестве макромолекулярной платформы для направленной доставки носителей заряженных противораковых лекарств или исследуемых молекул.Исследования на токсичность наногелей, загруженных лекарственным препаратом, выявили лучшие результаты исследования безопасности препарата, чем препараты на основе чистого лекарства.

Keywords: Block copolymer, ionic nanogels, drug delivery, folate -targeted delivery, ovarian cancer.

Description of a novel type of ionic nanogels with controlled spatial distribution of polymer chains, and discuss the potential application of these nanogels as carriers for delivery of anticancer drugs.Ionic nanogels appear to be promising and versatile macromolecular platform for carrier-based delivery of charged anticancer therapeutics or diagnostic molecules.Toxicity studies with drug-loaded nanogels indicate a better safety profile compared to free drug treatments.

Введение

Стратегии эффективной систематической доставки противораковых лекарств остаются ключевым аспектом успешного внедрения новых методов лечения рака. Использование наночастиц для направленной доставки терапевтических препаратов в область опухоли является одним из наиболее успешным и клинически перспективным аспектов в нанотехнологиях. Так, наноразмерные гидрогели (наногели) использовались в фармацевтике для развития новых методов лечения и диагностических методов. Они были созданы для получения различных соединений и даже частиц через взаимодействие электростатических, гидрофобных и водородных связей. Наногели являются очень перспективными соединениями при доставке лекарств, благодаря высокой способности к большим нагрузкам, высокой устойчивости и чувствительности к таким факторам окружающей среды, как ионные силы, pH и температура. В данной статье описывается новый тип ионных наногелей с регулируемым пространственным распределением полимерных цепочек и обсуждается возможности применения данных наногелей как носителей при доставке противораковых лекарств, также как и особенности их взаимодействия с клетками, перераспределение в тканях и токсичность.

Методы

Для получения ионных наногелей были использованы двойные гидрофильные блок сополимеры (графт-сополимеры), содержащие неионные и анионные полимерные сегменты (“блок” иономеры) [1]. Сочетание физико-химических методов (^{1}H ЯМР, гель-проникающая хроматография, статическое и динамическое рассеяния света (ДРС), потенциометрическое титрование, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и атомная силовая микроскопия (АСМ)) применялось для измерения размера, состава, электрокинетического потенциала, формы и структуры этих материалов. Химиопрепараты (доксорубицин (DOX) и цисплатин (CDDP) вводились в наногели простым смешением, в то время как несвязанное лекарство выделялось колонной NAP-10 и фильтрованием на фильтрах Amicon YM-30 с предварительной обработкой лекарства. Остаток Pt был проанализирован с помощью Масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), а остаток доксорубицина - с помощью УФ-спектрометра. Далее наногели взаимодействовали с фолиевой кислотой через химию дивинилсульфонов [2]. Получение активных наногелей фолиевой кислоты было подтверждено поверхностным плазмонным резонансом при использовании фолатносвязанных белков, иммобилизованных на золотой сенсорный чип с нанесением декстрана. Конфокальный анализ флуоресценции сортированных клеток и иммуногистохимическое исследование применялись для изучения проникновения наногеля в раковые и здоровые клетки. На живых организмах биораспределение, фармакокинетика и эффективность терапии направленных и ненаправленных наногелей с загрузкой лекарства тестировались на животной модели с раком яичников.

Результаты

Получение и характеристика наногелей

Синтез наногелей на подложке включает в себя самосборку и последующую самосшивку двойных гидрофильных блок сополимеров поли(этилен оксид)-б-поли(метакриловая кислоты) (ПЭО-*б*-ПМК), как показано на рис.1. Таким образом, (ПЭО-*б*-ПМК) блок сополимеры были сначала сконденсированы $CaCl_2$, что привело к образованию мицелл с оболочкой ПЭО и сложным ядром ПМК/Ca^{2+}. Далее ядро было химически сшито с этилендиамином в присутствии водорастворимого карбодиимида, а ионы Ca^{2+} были удалены этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТУ). Полученные полимерные мицеллы представлены полностью гидрофильными наногельными структурами с размерами 100-200 нм с набухшими ядрами сшитой ПМК, окруженной оболочкой ПЭО [1, 3, 4]. Эти наногели существенно набухали с ростом pH из-за

ионизации цепей ПМК в ядрах. Они имели сферическую структуру (рис. 1 В) и были практически однородны (такая узкая полидисперсность также подтверждалась результатами ДРС). Молярное соотношение этилендиаминаминных функциональных групп к группам карбоновой кислоты использовалось для контроля степени сшитости и pH чувствительности набухания наногелей. Набухание сопровождалось увеличением отрицательного заряда в цепи и было полностью обратимым. Наногели оставались устойчивыми при физиологических условиях в широких пределах концентраций (до 1,5% масса/объём) и не агригировали с прошествием месяцев. Мы продемонстрировали, что разработанный подход синтезирования наногелей является надежным и универсальным и позволяет создавать модификации с "мягким" ядром (т.е. сополимерный состав, гидрофобность сшивателя) и таким составом оболочки, который вследствие регулирует макроскопические свойства наногелей [3-5].

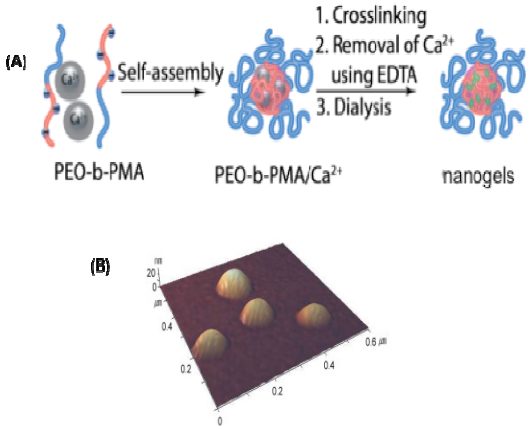

Рис. 1 - А) Схема получения наногелей на подложке; (В) Изображение наногеля, полученные атомной силовой микроскопия (АСМ)

Загрузка и высвобождение лекарства

Противораковые препараты, доксорубицин и цисплатин, были успешно введены в ионные ядра наногелей с существенно высокой эффективностью (до 50% масса/объём доксорубицина и 42% масса/объём для цисплатина) [6, 7]. В обоих случаях наблюдалось уменьшение размера и отрицательного разряда наногелей, что согласуется с нейтралиацией карбоксилатных групп лекарства. Загрузка лекарства сильно зависит от степени сшитости полимера и уменьшается при увеличении плотности сшивки. Наногели с загрузженным лекарством сохраняли стабильность диспергирования частиц, могли подвергаться сублимированной сушке и полностью восстанавливаться в водной дисперсии практически без изменения своего начального размера. Наногели с загруженным лекарством показывали устойчивость и pH чувствительность при высвобождении лекарства, что можно былол контролировать изменением степени сшитости ядра [6, 7]. Примечательно, что наногели с загрузкой цисплатином высвобождали биологически активные элементы Pt, способные образовывать аддукты при условиях, близких к внутриклеточной среде [6].

Неравномерная доставка и цитоксичность наногелей, загруженных лекарством

Мы продемонстрировали, что наногели быстро переходят в эпителиальные клетки рака и перемещаются в лизосомы [8]. Поглощение клеткой наногеля в клетках рака происходит преимущественно через ямочно-индуцированный эндоцитоз. В противоположность этому, в сливающихся здоровых эпителиальных клетках этот маршрут эндоцитоза отсутствовал на апикальной (верхушечной) стороне и наногели изолировались в регионах плотного соединения клеточной мембраны, не входя в клетки. Разрыв плотного соединения от недостатка кальция приводит к перераспределению наногеля внутри клекти. Используя наногели с доксорубицином, которые соединены с ПМК-цепями через pH-чувствительную гидразоновую связь, мы демонстрируем, что наногели, загруженные лекарством направляются в лизосомы, где лекарство освобождается через pH-зависимый механизм, и выставляется избирательная токсичность для раковых клеток, но является нетоксичной для нормальных эпителиальных клеток, которые формируют плтоные соединения [8]. Эти данные позволяют предположить, что ионные наногели проявляют способность проникать в клетки рака, но не в здоровые эпителиальные клеток, благодаря способности обнаруживать различия в механизмах эндоцитоза между этими клетками. Как и ожидалось, цитоксичная активность доксорубицина (DOX) и цисплатина (CDDP) значительно снизилась после введения в наногели. Важно, что было обнаружено, что наногели сами по себе нетоксичны во всем диапазоне концентраций, используемых для лечения препаратами на основе наногеля. Следует отметить, что временное накопление Pt было значительно выше в раковых клетках, обработанных

Таблица 1 - Цитотоксический эффект наногелей, загруженных доксорубицином (DOX) или цисплатином (CDDP) в карциномных клетках яичников A2780 (n=8)

Образец	IC_{50} (μg/mL)[a]	Относительный индекс[b]
DOX	0.024	1
Деградируемые наногели	0.058	2.5
Недеградируемые наногели	0.381	16.2
CDDP	0.254	1
Деградируемые наногели	1.082	4.3
Недеградируемые наногели	5.997	23.7

[a] IC_{50} представляет концентрацию для лекарства для 50% ингибирования в лабораторных условиях

[b] Относительный индекс представляет соотношение IC_{50} между контрольным соединением и наногелями в сравнении.

С помощью наногелей с цисплатином (CDDP) по сравнению с теми, получившими только цисплатин, но без наногеля (CDDP) [6]. Образцы с Pt образовали аддукты Pt с ядерной ДНК, хотя и в меньшей степени по сравнению со свободным лекарством без наногеля. Такое уменьшение соотносится с медленным высвобождением лекарства из наногелей и, таким образом, уменьшает цитоксичность лекарственных соединений (табл. 1).

Наногели с биоразлагаемыми сшивающими агентами

Мы предположили, что внутриклеточное разложение наногелей может усилить высвобождение лекарства. Это подтвердилось с помощью использования наногелей с низкоустойчивыми дисульфидными связями в ядрах (цистамин был использован в качестве биоразлагаемого сшивающего агента) [9, 10]. В присутствии восстанавливающего агента (например, глютатион) такие наногели быстро разлагались [10-12]. Значительное ускорение выхода лекарственного препарата наблюдалась в присутствии глютатиона или цистеина в среде высвобождения в сравнении с нередуктивной средой. Эти различия были указывали на более высокую цитотоксическую активность разлагаемых наногелей, загруженных лекарством (табл. 1).

Противоопухолевая активность наногелей, загруженных лекарством, у мышей

Биораспределение и фармокинеткананогелей, загруженных лекарством, тестировались на женских особях мышей, носителях ксенотрансплантатов A2780. Соединения наногелей показывали продолжительное сохранение препарата в циркуляции крови, что привело к увеличению уровня лекарства и времени пребывания в опухоли. Кроме того, концентрация доксорубицина (DOX) в сердце, почках и легких была значительно снижена наногелями, загруженными доксорубицином. Аналогично, наногели загруженные цисплатином (CDDP) демонстрируют показатели, примерно в 3 раза ниже максимальной концентрации Pt в почках - главного органа показывающего токсичность цисплатина (CDDP), чем мышей, обработанных только цисплатином без наногелей (CDDP). Органы, ответственные за удаление наногелей из кровотока, печени и селезенки имели повышенное содержание лекарства. Однако, такое накопление не приводит к нежелательным токсическим действием. Патологическая гистология тканей не выявила никаких изменений в почках, печени и селезенки в любой группе лечения наногелями. Значительное снижение роста опухоли ($p<0,05$) по сравнению со свободным лекарством без наногеля наблюдалось при лечении обоими типами состава наногелей, в то время как пустые наногели не демонстрировали тормозящего эффекта на рост опухоли. Важно отметить, что у животных, обработанных наногелями с лекарством, значительно снизился показатель токсичности по сравнению с чистым препаратом без наногеля ($p<0.05$).

Направленность наногелей с лекарством

Для дальнейшего накопления лекарства в участках опухоли и, тем самым, повышения его эффективности мы исследовали возможность поиска путей направленной доставки наногелей к опухоли. С этой целью, наногели были соединены с фолиевой кислотой (ФК) для направления фолатных рецепторов (ФР), которые сильно проявляются при раке яичников, но почти незаметны в здоровых тканях [2]. Плотность лигандов фолиевой кислоты была оптимизирована для поддержания высокой нагрузки лекарством, стабильности дисперсии и клеточного поглощения наногелей. Такие оптимизированыые наногели с фолиевой кислотой избирательно доставляют лекарство в отмеченные клетки с ФР, что приводит к относительно высокой цитотоксичной активности по сравнению с ненаправленными наногелями без ФР. Животные, которым ввели наногели фолиевой кислоты с цисплатином демонстрировали гораздо большее содержание Pt в опухоли по сравнению с обычной цистоплстиной и ненаправленными наногелями/цитопластом (рис 2a), что приводит к статистически значимому торможению роста опухоли по сравнению с ненаправленными наногелями наряду со снижением системной токсичности (рис. 2 b, c) [2]. Стоит отметить, что направленность в опухоль и противоопухолевый эффект были ингибированы свободной фолиевой кислотой, предполагая что наногели с фолиевой кислотой покажут избирательность фолата и обладают

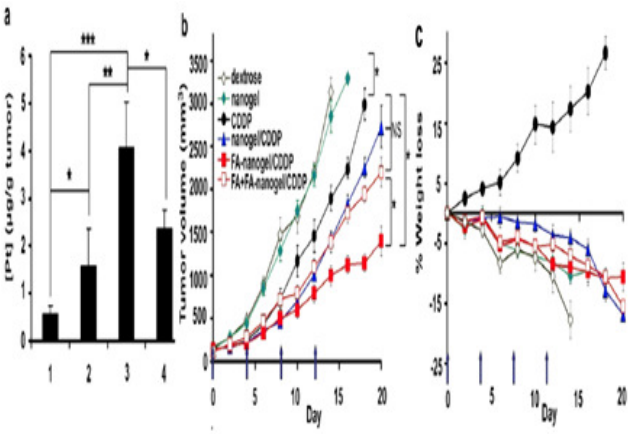

Рис. 2 - Противоопухолевое действие наногелей с цисплатином (CDDP) в женских особях мышей, носителях человеческих ксенотрансплантатов рака яичников A2780: a - накопление Pt в опухоли на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой (ICP- MS). Мыши были препарированы на 4 день после получения внутривенных инъекций (1) CDDP; 2 - CDDP/наногелей; 3 - CDDP/ФК-наногелей; 4 - смеси 1 мг/кг ФК и CDDP/ФК- наногеля. *n*= 4-5 (опухолей), *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001; b - Рост опухоли и (c) потеря веса тела после фиксирования соединений CDDP с дозой 4 мг CDDP эквивалент/каждый 4й день как показано стрелками. *n*= 7-8, *p< 0.05, **p< 0.01, NS – незначительные значения

повышенной активностью через определенный механизм фолата при исследовании на живом организме. В случае с наногелями, загруженными доксорубицином, оба наногеля (с фолиевой кислотой и без нее) показали сравнительную противоопухолевую активность. Эти данные позволяют предположить, что направленные наногели принесут больше выгоды при доставке лекарства с более медленной кинетикой высвобождения.

Выводы

Блок иономерные соединения, созданные на основе двойных гидрофильных сополимеров (ПЭО-б-карбоксилат-анионов) и ионов двухвалентных металлов были использованы для регулируемого синтеза на подложке нового типа мягких функциональных наноматериалов-ионных наногелей. Важно отметить, что разработанный подход синтезирования наногелей является надежным и универсальным и позволяет создавать соединения с ядром и оболочкой, которые впоследствии регулируют макроскопические свойства наногелей. Ионные наногели показали свою перспективность и универсальность в качестве макромолекулярной платформы для направленной доставки носителей заряженных противораковых лекарств или исследуемых молекул. Мы уверены, что рациональное проектирование общей структуры наногелей, в частности, их ионных ядер, может послужить эффективным инструментом для регулирования скорости высвобождения лекарств, дляоказании влияния на взаимодействие опухоли/клеток хозяина и для достижения желаемого терапевтического эффекта. Наногели с лекарством показали продолжительную циркуляцию крови и увеличенное накопление в опухоли. При испытании на животной модели мыши наногели показали улучшенные ответы на опухоли, чем препараты с чистым лекарством без наногеля. Исследования на токсичность наногелей, загруженных лекарственным препаратом, выявили лучшие результаты исследования безопасности препарата, чем препараты на основе чистого лекарства. Мы также показали эффективность отдельного антиракового лекарства: цисплатина, доставленного до ксенотрансплантатной опухоли при использовании таких наногелей на основе фолатных рецепторов. Таким образом, терапия, основанная на применении наногелей, может рассматриваться как эффективный способ лечения рака и открывает новые перспективы клинического развития подобных наносоединений.

Литература

1. Bronich, T.K., Keifer, P.A., Shlyakhtenko, L.S., Kabanov, A.V. Polymer micelle with cross-linked ionic core. J Am ChemSoc 127, 8236-8237 (2005).
2. Nukolova, N.V., Oberoi, H.S., Cohen, S.M., Kabanov, A.V., Bronich, T.K. Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer. Biomaterials 32, 5417-26 (2011).
3. Bontha, S., Kabanov, A.V., Bronich, T.K. Polymer micelles with cross-linked ionic cores for delivery ofanticancer drugs. J Control Release 114, 163-74 (2006).
4. Kim, J.O., Nukolova, N.V., Oberoi, H.S., Kabanov, A.V., Bronich, T.K. Block ionomer complexmicelles with cross-linked cores for drug delivery. PolymSciSer A ChemPhys 51, 708-718 (2009).
5. Bronich, T.K., Bontha, S., Shlyakhtenko, L.S., Bromberg, L., Hatton, T.A., Kabanov, A.V. Template-assisted synthesis of nanogels from Pluronic-modified poly(acrylic acid). J Drug Target 14, 357-66 (2006).
6. Oberoi, H.S., Laquer, F.C., Marky, L.A., Kabanov, A.V., Bronich, T.K. Core cross-linked block ionomer micelles as pH-responsive carriers for cis-diamminedichloroplatinum(II). J Control Release 153, 64-72 (2011).
7. Kim, J.O., Kabanov, A.V. &Bronich, T.K. Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin. J Control Release 138, 197-204 (2009).
8. Sahay, G., Kim, J.O., Kabanov, A.V., Bronich, T.K. The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents. Biomaterials 31, 923-33 (2010).
9. Kim, J., Oberoi, H.S., Bronich, T.K. Cross-linked polymer micelles with biodegradable ionic cores for anti-cancer drug delivery. Polymer Preprs 50, 372-373 (2009).
10. Kim, J.O., Sahay, G., Kabanov, A.V., Bronich, T.K. Polymeric micelles with ionic cores containing biodegradable cross-links for delivery of chemotherapeutic agents. Biomacromolecules 11, 919-26 (2010).
11. М.А. Ибрагимов, Вестник Казанского технологического университета, 9, 119 – 126 (2012).
12. А. Г. Лиакумович, А. П. Рахматуллина, М. А. Ибрагимов, Н. В. Галкина, Д. Г. Милославский, Вестник Казанского технологического университета, 20, 148 – 154 (2012).

© Т. К. Бронич – сотр. факультета фармацевтических наук и Центр доставки лекарств и наномедицины, Колледж Фармацевтики, Медицинский центр Университета Небраски, Omaha, NE 68198-5830, USA, address : tbronich@unmc.edu.