

СТАНДАРТИЗАЦИЯ НАНОРАЗМЕРНОЙ ФОРМЫ ПАКЛИТАКСЕЛА В СОСТАВЕ КОНЪЮГАТА ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ С БЕЛКОВОЙ ВЕКТОРНОЙ МОЛЕКУЛОЙ

М.Б. Сокол

мл. науч. сотрудник, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (Москва, Россия)
E-mail: mariyabsokol@gmail.com

Н.Г. Яббаров

к.б.н., Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (Москва, Россия)

М.Р. Моллаева

аспирант, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (Москва, Россия)

М.В. Фомичева

мл. науч. сотрудник, Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (Москва, Россия)

В.Ю. Балабаньян

д.фарм.н., Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова (Москва, Россия)

Е.Д. Никольская

к.х.н., Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН;
Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения (Москва, Россия)

Актуальность. Паклитаксел (Ptx) – химиотерапевтическое средство, применение которого ограничено из-за выраженных побочных эффектов вспомогательных компонентов и неспецифичности действия Ptx. Предложена новая наноразмерная лекарственная форма Ptx для адресной высокоэффективной терапии злокачественных новообразований и снижения уровня побочных эффектов.

Цель исследования. Разработка перечня основных показателей для стандартизации нового готового лекарственного средства (ГЛС) паклитаксела, имеющего в своем составе полимерный носитель и белковую векторную молекулу.

Материал и методы. При составлении нормативной документации руководствовались ОФС.1.4.1.0007.15 ГФ XIV «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС.1.7.1.0011.18 ГФ XIV «Биотехнологические лекарственные препараты».

Результаты. Для оценки качества ГЛС предложены испытания по показателям и установлены нормы: «Размер частиц» (от 250 до 300 нм), «рН суспензии» (5,8–7,6), «Время получения восстановленного препарата» (не более 15 мин), «Проходимость суспензии через иглу», «Седиментационная устойчивость» (не менее 4 ч), «Содержание воды» (не более 3%), «Механические включения», «Подлинность» и «Количественное определение» (содержание паклитаксела не менее 4,5% и не более 5,5%), «Чистота» (не менее 95%), «Органические примеси» (не более 3,7%), «Остаточные органические растворители» (содержание хлористого метилена не более 0,06%), «Тяжелые металлы» (содержание олова не более 640 ppm), «Однородность массы» (отклонение от средней массы не более 10%), «Остаточная ДНК штамма-производителя» (не более 10 пг/мг), «Бактериальные эндотоксины» (не более 0,25 ЕЭ/мг), «Стерильность».

Выводы. Предложены параметры контроля качества, обеспечивающие безопасность и эффективность оригинального ГЛС для противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: паклитаксел, стандартизация, PLGA, альфа-фетопротеин, наночастицы.

Для цитирования: Сокол М.Б., Яббаров Н.Г., Моллаева М.Р., Фомичева М.В., Балабаньян В.Ю., Никольская Е.Д. Стандартизация наноразмерной формы паклитаксела в составе конъюгата полимерных наночастиц с белковой векторной молекулой. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021;24(7):18–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-07-03>

Паклитаксел (Ptx) – митотический ингибитор таксанового ряда, используемый в химиотерапии злокачественных новообразований. Одобренная

FDA форма паклитаксела (Taxol®) содержит в своем составе солибилизатор (Cremophor EL), использование которого сопряжено с возникновени-

ем тяжелых аллергических реакций. Кроме того, применение паклитаксела ограничено из-за таких побочных эффектов как нефро- и нейротоксичность [1]. Таким образом, разработка новой лекарственной формы паклитаксела с улучшенным профилем безопасности на сегодняшний момент остается актуальной [1, 2].

Одной из стратегий увеличения растворимости и биодоступности гидрофобных молекул является их инкапсулирование в наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA). PLGA широко используется в создании систем адресной доставки благодаря таким свойствам, как: биосовместимость, биodeградация и возможность функционализации поверхности. Коллективом авторов был разработан метод получения наночастиц PLGA, содержащих Ptx, с рекомбинантным третьим доменом *альфа*-фетопротейна (rAFP3d-NP) [3]. В состав полученного конъюгата не входят токсичные солибилизаторы, а специфичность накопления Ptx в клетках-мишенях обусловлена наличием на поверхности наночастиц рекомбинантного рецептор-связывающего фрагмента (третьего домена) *альфа*-фетопротейна (rAFP3d), который является хорошо известным опухолевым маркером [4].

Одной из ключевых характеристик в стандартизации наноразмерных форм считается размер наночастиц. Наиболее оптимальными для данного показателя являются значения до 400 нм, поскольку такие размеры обуславливают возможность пассивного транспорта веществ, благодаря эффекту повышенной проницаемости и удерживания (EPR-эффект) [5]. Активный транспорт наночастиц для таргетной доставки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза характерен для объектов с размерами 200–300 нм [6]. Данные закономерности были учтены при разработке и стандартизации исследуемого готового лекарственного средства (ГЛС) паклитаксела.

Ц е л ь и с л е д о в а н и я – разработка перечня основных показателей для стандартизации новой лекарственной формы Ptx, имеющей в своем составе полимерный носитель и белковую векторную молекулу.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования представляет собой ГЛС в виде лиофилизата наночастиц PLGA, содержащих Ptx, конъюгированных с белковой векторной молекулой. Препарат вводится внутривен-

но. Требования к разрабатываемому лекарственному средству изложены в общей фармакопейной статье ОФС.1.4.1.0007.15 ГФ XIV «Лекарственные формы для парентерального применения» и ОФС.1.7.1.0011.18 ГФ XIV «Биотехнологические лекарственные препараты».

Размер частиц устанавливали согласно ISO 22412:2008 с помощью метода динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 instrument (Malvern Instruments, Великобритания).

Согласно ОФС.1.2.1.0004.15 «Ионометрия» ГФ XIV, определяли pH суспензии потенциометрическим методом [7].

Время получения восстановленного препарата оценивали визуально на шести образцах лабораторной серии rAFP3d-NP. В каждый флакон вводили 20 мл 0,9%-ного раствора хлорида натрия и перемешивали при комнатной температуре до полного восстановления суспензии.

Проходимость суспензии через иглу и ее седиментационную устойчивость определяли согласно ОФС.1.4.1.0010.15 «Суспензии» ГФ XIV визуальным методом [7].

Содержание воды в ГЛС находили по ОФС.1.2.3.0002.15 «Определение воды» ГФ XIV методом Фишера (полумикрометод) [7].

Испытания на видимые механические включения проводили согласно ОФС.1.4.2.0005.15 ГФ XIV «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах». Невидимые механические включения определяли по ОФС.1.4.2.0006.15 ГФ XIV «Невидимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения» с помощью микроскопии (метод 3) [7].

Подлинность и количественное определение Ptx проводили по ОФС.1.2.1.2.0005.15 ГФ XIV «Высокоэффективная жидкостная хроматография» [7]. Анализ выполняли с помощью системы, состоящей из бинарного насоса 1525 и УФ-детектора 2487 (Waters, США).

Разделение проводили на колонке Reprosil ODSC-18 с размерами 150 мм × 4,6 мм × 5 мкм (Dr. Maisch GmbH, Германия). Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (Fisher Scientific, Великобритания) и 0,1%-ной фосфорной кислоты (Merck, США) в соотношении 50:50. Скорость потока и длина волны детектирования составили 1 мл/мин и 227 нм соответственно [3].

Количественное определение третьего домена *альфа*-фетопротейна (rAFP3d) в растворе ГЛС проводили по ОФС.1.2.3.0012.15 ГФ XIV «Определение белка» колориметрическим методом с бидинхониновой кислотой (метод 4) [7].

Электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях осуществляли согласно методике, описанной в ОФС.1.2.1.0023.15 ГФ XIV [7].

Органические примеси Ptx определяли по ОФС.1.2.1.2.0005.15 ГФ XIV «Высокоэффективная жидкостная хроматография» с помощью системы, указанной ранее [7]. Разделение выполняли на колонке Gemini C18 с размерами 150 мм × 4,6 мм × 5 мкм (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из ацетонитрила («Fisher Scientific», Великобритания) (Б) и 50%-ного водного раствора ацетонитрила (А). Градиентный режим элюирования состоял из 30 мин А и последующего линейного градиента 0-90% Б за 40 мин. Скорость потока и длина волны детектирования составили 1,1 мл/мин и 227 нм соответственно.

Остаточные органические растворители определяли согласно ОФС.1.2.1.2.0004.15 «Газовая хроматография» ГФ XIV [7] на приборе Trace GC Ultra («Thermo Scientific», США) с масс-селективным детектором. Разделение компонентов выполняли на DB-624 («Agilent Technologies», США) с размерами 30 м × 0,32 мм и толщиной слоя 1,80 мкм. В качестве газа-носителя использовали гелий.

Тяжелые металлы нормировали, исходя из требований руководства по элементным примесям (ICH Q3D) [8].

Также определяли следующие показатели:

однородность массы ГЛС – по ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм» ГФ XIV по методике для твердых лекарственных форм [7];

бактериальные эндотоксины – по ОФС.1.2.4.0006.15 «Бактериальные эндотоксины» ГФ XIV методом Б (гель-тромб тест) [7] с помощью коммерческого набора E-ТОХАТЕ (Sigma-Aldrich, США), согласно инструкции производителя;

остаточную ДНК штамма-производителя – по МУК 4.1/4.2.588–96 методом молекулярной гибридизации [9];

стерильность – по ОФС.1.2.4.0003.15 «Стерильность» ГФ XIV методом мембранной фильтрации [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения показателя «размер частиц» были установлены с учетом описанных во введении закономерностей [5, 6] и особенностей технологического процесса получения rAFP3d-NP. Размер наночастиц составил от 250 до 300 нм.

Показатель «рН суспензии» вводится для контроля стабильности ГЛС. Входящий в состав препарата PLGA наиболее стабилен при значениях рН 5,0–9,6 [10], а rAFP3d – при рН 7,4 [11]. Значения результатов потенциометрического измерения рН в ГЛС в среде 0,9%-ной NaCl входили в диапазон 5,8–7,6.

Время получения восстановленного препарата (ресуспендируемость) отражает качество ГЛС и не должно превышать 15 мин при указанных условиях. Соответствие этим требованиям было экспериментально подтверждено.

Суспензия для инфузий должна обладать седиментационной устойчивостью на протяжении всего времени введения препарата и свободно проходить в шприц через иглу 0,8×40 мм. Экспериментально было подтверждено соответствие указанным требованиям, при этом время седиментационной устойчивости суспензии составило 4 ч.

Содержание воды также является критерием стабильности ГЛС, в частности, входящего в его состав полимера. Известно, что при адсорбции PLGA более 3% воды из воздуха происходит значительная потеря молекулярной массы, что, скорее всего, связано с гидролизом полимера [12]. Экспериментальное значение содержания воды составило 0,9%, что является допустимым.

При оценке механических включений визуально было подтверждено отсутствие видимых частиц в суспензии. Количество невидимых частиц не превышало установленных норм [7].

Подлинность и количественное определение Ptx оценивали с помощью ВЭЖХ. В случае установления подлинности время удерживания стандартного образца Ptx должно соответствовать времени удерживания испытуемого образца. Количественное определение Ptx характеризует общее содержание паклитаксела в rAFP3d-NP. Содержание Ptx составило 5,1%, что удовлетворяет требованиям (не менее 4,5% и не более 5,5%).

Количественное определение третьего домена *альфа*-фетопротейна (rAFP3d) проводили с помощью колориметрического метода с бидинхониновой кислотой. Сопутствующее влияние вспомога-

тельных веществ учитывали, нормализуя оптическую плотность модельного раствора (rAFP3d-NP без белковой молекулы) к испытуемому. Испытуемый образец должен содержать не менее 12,3% и не более 13,3% rAFP3d. Содержание rAFP3d составило 12,8%, что входит в установленный диапазон.

Электрофорез в ПААГ позволяет оценить чистоту белковой молекулы в составе ГЛС и контро-

лировать родственные (димеры, агрегаты белка и др.) и технологические (остаточные белки клеток-продуцентов) примеси. Электрофорез в восстанавливающих условиях в 12%-ном ПААГ показал наличие полосы белка между полосами белков-маркеров, соответствующих массам 35 и 25 кДа, что соответствует теоретическому значению молекулярной массы rAFP3d, равному 27кДа (рисунок).

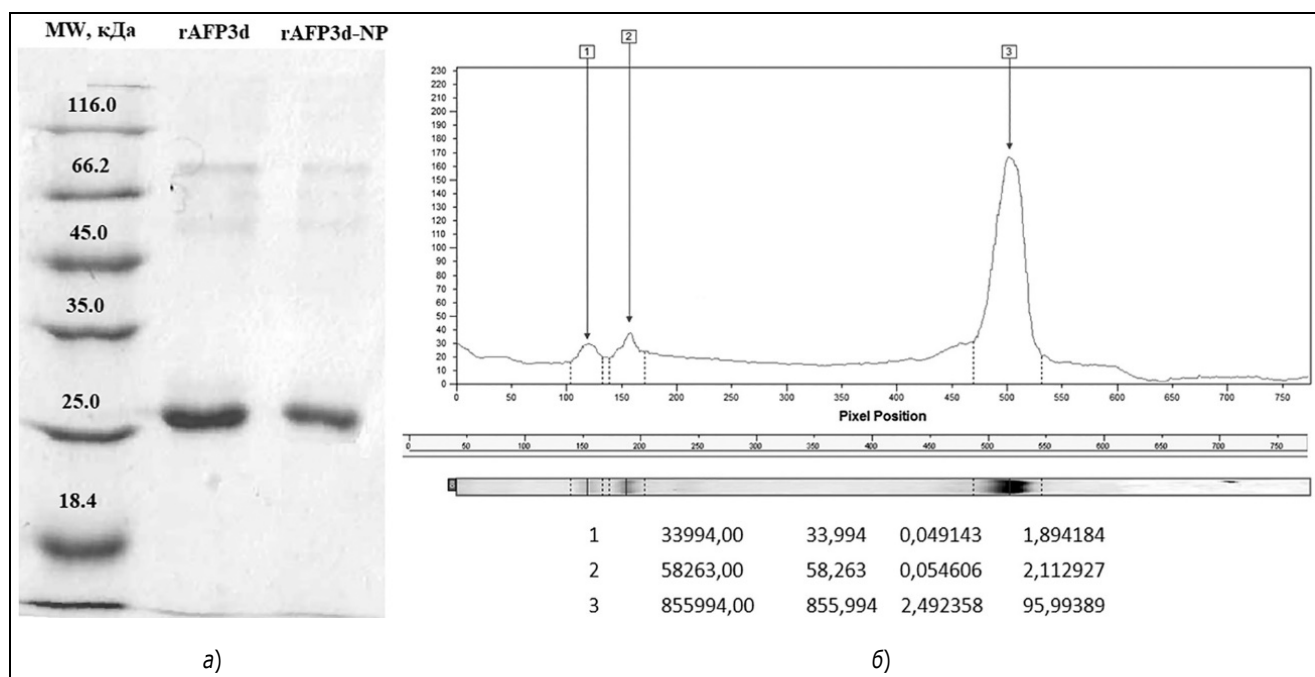


Рисунок. Электрофореграмма rAFP3d-NP: а – в условиях денатурирующего электрофореза в 12% ПААГ; б – после денситометрической обработки

Анализ чистоты rAFP3d проводили с помощью программного обеспечения Total Lab (Total Lab, Великобритания), сравнивая денситометрически основную полосу на геле относительно общей массы всех полос. Чистота белковой молекулы составила не менее 95%.

Испытание на наличие органических примесей позволяет оценить содержание продуктов деградации фармацевтической субстанции и технологические примеси, обусловленные технологией производства. По результатам ВЭЖХ родственные примеси паклитаксела не должны превышать 3,7%. Данный показатель был нормирован по результатам проведения доклинических испытаний токсичности ГЛС.

Остаточные органические растворители. Технологический процесс получения rAFP3d-NP включает в себя использование хлористого метилена – растворителя 2-го класса токсичности.

Остаточное количество хлористого метилена не превышало 0,032%, что входит в допустимый предел концентрации (не более 0,06%) [7].

Тяжелые металлы. При производстве PLGA используется катализатор октонат олова, содержание которого, согласно спецификации производителя (Purasorb), не превышает 100 ppm. Допустимая суточная доза олова с учетом разовой и суточной доз ГЛС 1000 мг составляет 640 ppm, что превышает значение, заявленное в спецификации [13]. Таким образом, значение содержания олова удовлетворяет требованиям руководства по элементным примесям (ICH Q3D) [8]. При оценке ГЛС по показателю «однородность массы дозирования лекарственных форм» было установлено, что средняя масса образцов опытной партии ГЛС составила 1000 ± 25 мг, что удовлетворяет требованию ГФ XIV [7].

Остаточная ДНК штамма-продуцента является биологической примесью, наличие которой обу-

словлено методом получения белковой молекулы, входящей в состав ГЛС. Содержание остаточной ДНК штамма-производителя составило менее 10 пг/мг, что соответствует рекомендациям ВОЗ [10].

Значение бактериальных эндотоксинов в ГЛС не превышало 0,25 ЕЭ/мг, что допустимо с учетом предполагаемой терапевтической дозы для человека 400 мг/м².

Критерий «стерильность» является обязательным при стандартизации лекарственных форм для парентерального применения. Методом мембранной фильтрации было доказано отсутствие роста микроорганизмов и подтверждена стерильность полученного ГЛС.

ВЫВОДЫ

Изложенные основные показатели могут быть использованы для стандартизации ГЛС адресного действия в виде лиофилизата наночастиц PLGA, содержащих Рtx, конъюгированных с белковой векторной молекулой (rAFP3d) для парентерального применения. Методики контроля качества по предложенным показателям могут применяться для стандартизации подобных ГЛС.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Sofias A.M., Dunne M., Storm G., et al.* The battle of “nano” paclitaxel. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2017; 122: 20–30.
2. *Мурашова Н.М., Трофимова Е.С., Юртов Е.В.* Динамика научных публикаций по применению наночастиц и наноструктур для адресной доставки лекарственных веществ. *Наноиндустрия.* 2019; 12(1): 24–38 (Murashova N.M., Trofimova E.S., Jurto E.V. Dinamika nauchnyh publikacij po primeneniju nanochastic i nano-struktur dlja adresnoj dostavki lekarstvennyh veshhestv. *Nanoindustrija.* 2019; 12(1): 24–38).
3. *Sokol M., Zenin V., Yabbarov N., et al.* Validated HPLC method for paclitaxel determination in PLGA submicron particles conjugated with α -fetoprotein third domain: sample preparation case study. *Ann. Pharm. Franc.* 2021.
4. *Naz Z., Usman S., Saleem K. et al.* Alpha-fetoprotein: A fabulous biomarker in hepatocellular, gastric and rectal cancer diagnosis. *Biomed. Res.* 2018; 29: 2478–2483.
5. *Salvioni L., Rizzuto M. A., Bertolini J. A. et al.* Thirty years of cancer nanomedicine: success, frustration, and hope. *Cancers.* 2019; 11(12): 1–21.
6. *Huang W., Zhang C.* Tuning the size of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles fabricated by nanoprecipitation. *Biotechnol. J.* 2018; 13(1): 1–19.
7. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.: МЗРФ. 2018; Т. 1–4: 7019 с. (Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii. HIV izd. M.: MZRF. 2018; T. 1–4: 7019 s.)
8. *Guideline I. C. H. H.* Guideline for elemental impurities Q3D (R1). 2018: 1–85.
9. МУК 4.1/4.2.588-96. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. М.: МЗ РФ. 1998: 1–87 (MUK 4.1/4.2.588-96. Metody kontrolja medicinskih immunobiologicheskikh preparatov, vvodimyh ljudjam. M.: MZ RF. 1998: 1–87).
10. *Zolnik B.S., Burgess D.J.* Effect of acidic pH on PLGA microsphere degradation and release. *J. Control. Release.* 2007; 122(3): 338–344.
11. *Mollaev M., Gorokhovets N., Nikolskaya E., et al.* Recombinant alpha-fetoprotein receptor-binding domain co-expression with polyglutamate tags facilitates *in vivo* folding in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* 2018; 143: 77–82.
12. *D'Souza S., Dorati R., DeLuca P.P.* Effect of hydration on physicochemical properties of end-capped PLGA. *Adv. Biomater.* 2014; 2014: 1–10.
13. <http://www.corbion.com/biomedical/products/polymers-for-drug-delivery>.

Поступила 1 апреля 2021 г.

STANDARDIZATION OF PACLITAXEL FORMULATION CONSISTING OF A CONJUGATE OF POLYMER NANOPARTICLES WITH A PROTEIN VECTOR MOLECULE

© Authors, 2021

M.B. Sokol

Junior Research Scientist, Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel of Russian Academy of Sciences; Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy (Moscow, Russia)
E-mail: mariyabsokol@gmail.com

N.G. Yabbarov

Ph.D. (Biol.), Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel of Russian Academy of Sciences; Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy (Moscow, Russia)

M.R. Mollaeva

Post-graduate Student, Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel of Russian Academy of Sciences; Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy (Moscow, Russia)

M.V. Fomicheva

Junior Research Scientist, Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel of Russian Academy of Sciences; Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy (Moscow, Russia)

V.Yu. Balaban'yan

Dr.Sc. (Pharm.), Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russia)

E.D. Nikolskaya

Ph.D. (Chem.), Institute of Biochemical Physics named after N.M. Emanuel of Russian Academy of Sciences;
Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy (Moscow, Russia)

Relevance. A chemotherapeutic agent paclitaxel (Ptx) has limited usage because of the pronounced side effects of excipients and the non-specificity of Ptx action. We proposed a novel Ptx formulation for targeted therapy of malignant neoplasms and reducing the level of side effects.

Aim of the study was to develop a normative documentation for standardization of a novel Ptx formulation consisting of a polymer matrix and a protein vector molecule.

Material and methods. When compiling the normative documentation, we were guided by GPM.1.4.1.0007.15 of The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV "Dosage forms for parenteral use" and GPM.1.7.1.0011.18 of The State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV "Biotechnological drugs".

Results. The quality assessment of Ptx formulation was proposed according to the following attributes: "Particle size" (250–300 nm), "pH of the suspension" (5.8–7.6), "Reconstitution time" (no more than 15 min), "Passage of the suspension through the needle", "Sedimentation stability" (not less than 4 h), "Water content" (no more than 3%), "Mechanical inclusions", "Identity" and "Quantification" (paclitaxel concentration not less than 4.5% and no more than 5.5%), "Purity" (not less than 95%), "Organic impurities" (no more than 3.7%), "Residual organic solvents" (methylene chloride concentration no more than 0.06%), "Elemental impurities" (tin concentration not more than 640 ppm), "Uniformity of mass" (deviation from the average mass no more than 10%), "Residual DNA" (no more than 10 pg/mg), "Bacterial endotoxins" (no more than 0.25), "Sterility".

Conclusions. Quality control parameters were proposed to ensure the safety and efficacy of the original FPP for anticancer therapy.

Key words: paclitaxel, standardization, PLGA, alpha-fetoprotein, nanoparticles.

For citation Sokol M.B., Yabbarov N.G., Mollaeva M.R., Fomicheva M.V., Balaban'yan V.Yu., Nikolskaya E.D. Standardization of paclitaxel formulation consisting of a conjugate of polymer nanoparticles with a protein vector molecule. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2021;24(7):18–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-07-03>



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Алпизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavescens* Rerel et Schmalh). По сравнению с ацикловиrom обладает более широким спектром действия.

Аммифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Анмарин (линимент, гель, лосьон (раствор)), рег. №№ 90/248/1; 95/178/5; 90/248/4 – антифунгальное, противогрибковое средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Гипорамин (таблетки, мазь, суппозитории, лиофилизат), рег. №№ 98/305/1; 98/305/10; 98/305/12 – противовирусное средство, получаемое из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.).

Глицирам (таблетки, гранулы), рег. №№ 76/252/7; 70/730/48; 88/542/3 – оказывает противовоспалительное стимулирующее действие на кору надпочечников, умеренно отхаркивающее средство, получаемое из корней и корневищ солодки го-лой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru