

Софийски Университет “Св. Климент Охридски”
Факултет по Химия и Фармация

Георги Георгиев Йорданов

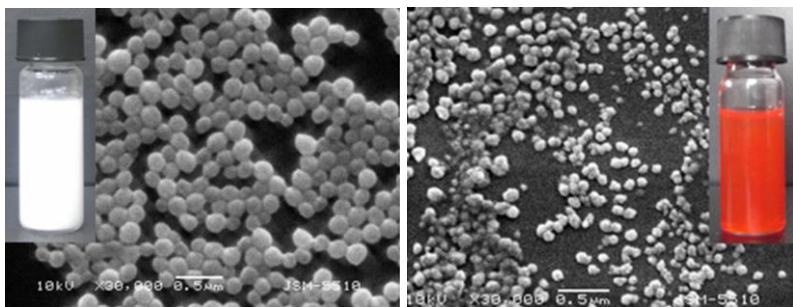
**Нанотехнологии за лекарствено доставяне:
Получаване и охарактеризиране на полимерни
наночастици за биомедицински приложения**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация за присъждане на
научна степен “доктор на науките”

Професионално направление

4.2 “Химически науки”



София, 2017

Дисертацията е написана на английски език, съдържа 230 страници, включени са 109 фигури и 17 таблици. Цитирани са 390 литературни източника. Дисертационният труд е базиран на изследвания, отразени в 26 публикации (включващи две глави от книги), които са получили повече от 120 независими цитата в научната литература.

Дисертацията е обсъдена и насочена за защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Неорганична химия към Факултета по Химия и Фармация на СУ „Св. Климент Охридски“, проведен на 17.11.2017 г.

На корицата: Наночастици от PBCA (*вляво*) и натоварени с епирубидин наночастици от PSMA (*вдясно*).

Защитата на дисертационния труд ще се състои на Г.
от часа в заседателната зала на Факултета по Химия и Фармация на Софийския Университет „Св. Климент Охридски“.

Съдържание:

Въведение	3
Наночастици от PASCА като лекарствени носители	5
<i>Получаване и охарактеризиране на PBCA наночастици</i>	5
<i>Флуоресцентно маркирани PECA наночастици</i>	11
<i>PASCА наночастици като носители на антибиотици</i>	16
PECA наночастици като носители на цефалексин.....	16
PBCA наночастици като носители на ципрофлоксацин.....	20
<i>PBCA наночастици като носители на еконазол</i>	26
<i>PBCA наночастици като носители на цитостатици</i>	29
PBCA наночастици натоварени с хлорамбуцил.....	29
PBCA наночастици натоварени с етопозид.....	34
PBCA наночастици натоварени с епирубицин.....	36
<i>Взаимодействия между протеини и PBCA-базираны наночастици.....</i>	48
Наночастици от PSMA като лекарствени носители	51
<i>Получаване на PSMA наночастици и натоварване с епирубицин</i>	51
<i>Наночастици от PBCA/PSMA като носители на епирубицин</i>	55
Резюме на основните резултати	59
Приноси.....	63
Научни публикации	67
Участия в научни конференции	70

Използвани съкращения

Аро – аполипопротеин
BBB – кръвно-мозъчна бариера
BCA – бутилцианоакрилат
CA – лимонена киселина
CHL – хлорамбуцил
CIP – ципрофлоксацин
CNS – централна нервна система
CPX – цефалексин
D40 – декстран 40
DLS – динамично светоразсейване
ECA – етилцианоакрилат
ECN – еконазол
EDX – енергийно-дисперсионна спектроскопия
EPI – епирубицин
EPR – увеличена пропускливост и задържане
ETO – етопозид
F68 – Pluronic F68 (полоксамер 188)
FTIR – инфрачервена спектроскопия
GPC – гел-проникваща хроматография
IgG – имуноглобулин G
IgM – имуноглобулин M
MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиев бромид
NMR – ядрено-магнитен резонанс
P188 – полоксамер 188 (Pluronic F68)
P80 – полисорбат 80 (Tween 80)
PACA – полиалкилцианоакрилат
PBCA – полибутилцианоакрилат
PBS – физиологичен фосфатен буфер
PBST – физиологичен фосфатен буфер с Tween 80
PEBCA – поли(етилбутилцианоакрилат)
PECA – полиетилцианоакрилат
PEG – поли(етиленгликол)
PEO – поли(етиленоксид)
PLGA – поли(млечна-съ-гликолова киселина)
PSMA – поли(стирен-съ-малеинова киселина)
PPO – поли(пропиленоксид)
R6G – Родамин 6G (Rhodmine 6G)
RES – ретикулоендотелна система
SEM – сканираща електронна микроскопия
SPR – повърхностен плазмон резонанс
STD – стандартно отклонение
STEM – сканираща трансмисионна електронна микроскопия
TEM – трансмисионна електронна микроскопия
TLC – тънкослойна хроматография

Въведение

Необходимостта от по-ефективна и по-безопасна химиотерапия на различни заболявания и патологични състояния е основният мотив за разработването на нови системи за доставяне на лекарства. Напредъкът във фармацевтичните нанотехнологии доведе до възникването на редица полимерни наноматериали, предназначени за приложения като системи за доставяне на лекарства. Наномедицината се очертава като нова интердисциплинарна област в резултат от сближаването на медицината и фармацията с нанотехнологиите. Различни наночастици с размери от няколко нанометра до няколко стотици нанометра са вече разработени за използване в терапията и диагностиката, при което малкият им размер се определя от редица биологични и физиологични съображения. Наночастиците могат да се използват като носители на различни видове биологично-активни вещества с цел да се осигури повишена бионаличност, целево доставяне, контролирано освобождаване и намалена ефективна доза. Успешните експерименти в тази област доведоха до няколко клинично одобрени формулировки на цитостатици и други лекарства.

Колоидните наночастици на основата на полиалкилцианоакрилати (PACA) се изучават вече почти четири десетилетия и се оказват обещаващи за получаването на нови лекарствени форми с повишен терапевтичен потенциал и намалена системна токсичност, най-вече в сферата на онкологията (Vauthier et al. 2003; Nicolas and Couvreur 2009). Също така, демонстрирано е целевото доставяне на антибиотици до инфектирани клетки чрез PACA наночастици (Pinto-Alphandary et al. 2000). Например, вграждането на ампицилин в наночастици от поли(изохексилцианоакрилат) (PIHCA) е довело до почти 120-кратно увеличаване на антибиотичната ефективност при третиране на експериментална салмонелоза (Fattal et al. 1989; Balland et al. 1994). Предимствата от лекарственото насочване на цитостатици с помощта на PACA наночастици е също така демонстрирано в модели на глиобластомата (Wohlfart et al. 2011). Няколко формулировки на основата на PACA наночастици са достигнали до фази II и III на клинични изпитвания при пациенти с напреднал хепатоцелуларен карцином. Например, при фаза II на клинични изпитвания с митоксантрон-натоварени наночастици от полибутилцианоакрилат (PBACA) е било демонстрирано удължена преживяемост при 108 пациенти с нерезектиран хепатоцелуларен карцином (Zhou et al. 2009). Доксорубицин, формулиран с 100-300 nm-ови наночастици от PIHCA (Livatag®) в момента е във фаза III на клинично изпитване от 2011 г., чиято цел е

да установи ефикасността на формулировката при третиране на напреднал хепатоцелуларен карцином (Soma et al. 2012). Колоидните лекарствени форми на основата на поли(стирен-съ-малеинова киселина) (PSMA) също са обещаващи при третирането на напреднали неопластични заболявания. Например, различни формулировки на неокарциностин, конюгиран с PSMA (означаван като SMANCS), са тествани в пилотни проучвания при пациенти с различни солидни тумори на яйчниците, хранопровода, белия дроб, стомаха, надбъбречните жлези и мозъка (Maeda et al. 2001).

Независимо от постигнатите до момента положителни резултати, разработките на нови нано-формулировки на различни лекарствени вещества са необходим етап от разширяването на приложенията им и подобрението на ефикасността им. Очаква се получаването на нови формулировки на основата на наночастици да допринесе за обогатяване на знанията в тази област и за постигането на по-специфично насочване и доставяне на лекарствените вещества.

Целта на тази дисертация е да представи получаването и охарактеризирането на някои нови колоидни формулировки на антибиотици, антимиотици и цитостатици на основата на наночастици от поли(алкил-2-цианоакрилат) и поли(стирен-съ-малеинова киселина). Тя обобщава резултатите от деветгодишни (2009-2017 г.) проучвания на автора (д-р Георги Йорданов) в областта на фармацевтичните нанотехнологии. Дисертацията включва резултати, публикувани изцяло или частично в 26 научни труда, включително две глави от книги и 15 научни статии в реферирани и индексирани издания. Изследователската работа по получаване и охарактеризиране на наночастиците е осъществена от д-р Йорданов с помощта на Зорка Беджова и Надежда Ангелова във Факултета по Химия и Фармация на СУ „Св. Климент Охридски“. Биологичните експерименти с ракови клетки са проведени с водещото участие на д-р Р. Скробанска и д-р А. Евангелатов в Биологическия факултет на СУ в периода 2011-2013 г. и са представени тук като илюстрация на цитоксичните свойства на наночастиците. Експериментите с SPR техника са проведени от д-р Г. Йорданов по време на посещения в Института по Химия към Словашката Академия на Науките с помощта на д-р Jaroslav Katrlík и д-р Peter Gemeiner. Повечето от представените изследвания са проведени с финансовата подкрепа на Фонд „Научни Изследвания“ (проект ДМУ 03/111), CMST COST Action D43 (Colloid and Interface Chemistry for Nanotechnology) и CMST COST Action CM1101 (Colloidal Aspects of Nanoscience for Innovative Processes and Materials).

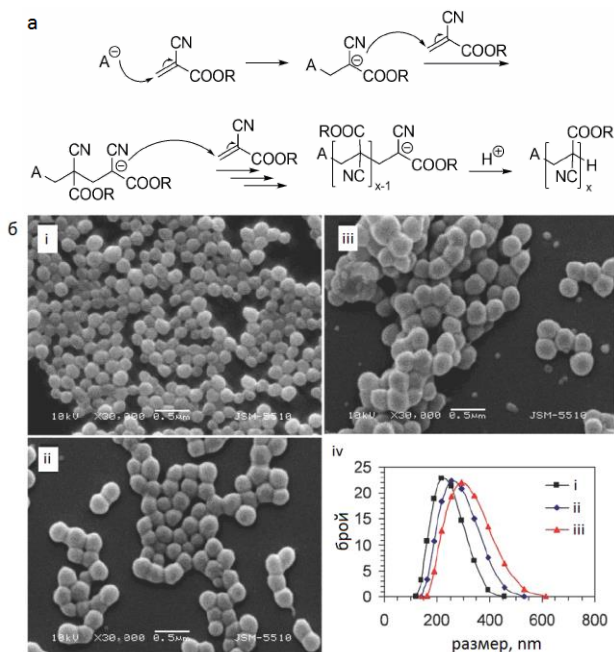
Наночастици от РАСА като лекарствени носители

Получаване и охарактеризиране на РВСА наночастици

Ползването на наночастици от полибутилцианоакрилат (РВСА) в качеството на лекарствени носители изисква познаването най-общо на въздействието на различни параметри при получаването им върху физикохимичните им характеристики и тяхната цитотоксичност. Този тип частици се получават обикновено чрез контролирана емулсионна полимеризация, протичаща по анионен механизъм (Фиг. 1а), във водна среда и в присъствие на фармацевтично приемливи подкисляващ агент и колоиден стабилизатор. От литературата са известни проучвания върху ефекта на температурата, рН, концентрацията на мономер, вид и концентрация на електролити, подкисляващ агент (Douglas et al. 1984), както и използването на различни стабилизатори (Douglas et al. 1985). Тези проучвания показват, че процесът се влияе от множество фактори. Поради тази причина, ефектите на фактори, като концентрация на мономер и подкисляващ агент, бяха проучени при получаването на ненатоварени (без лекарство) РВСА частици в условията, най-често прилагани от нас при получаване на различни лекарствени формулировки на основата на РВСА наночастици, а именно частици, стабилизиращи с полуксамер 188 и бутилцианоакрилат произведен от „Специални полимери” ООД (България). Беше проведено също така изследване на цитотоксичното въздействие на ненатоварените РВСА частици върху ракови (HeLa) клетки. В практически всички публикувани в научната литература изследвания с лекарствено-натоварени РВСА частици, ненатоварените се използват в качеството на контрола, която най-често се отчита като „нетоксична”, поради което анти-пролиферативните свойства на ненатоварени РВСА наночастици върху ракови клетки не са изследвани детайлно.

При проведените от нас проучвания беше установено, че при концентрации на използвания стабилизатор полуксамер 188 (Pluronic F68) под 0,1 wt% се получава нестабилна дисперсия, поради което концентрацията му е поддържана постоянна при всички експерименти на 2.0 mg/ml (0,2 wt%). Дисперсии на наночастици с концентрация на полуксамер 0,05 wt%, които са стабилни поне няколко седмици, са получени чрез пост-синтетична подмяна на дисперсната среда (чрез центрофугиране и ултразвуково редицергиране). Наблюденията със сканиращ електронен микроскоп (SEM) показват, че при изследваните условия на емулсионна полимеризация на бутил-2-цианоакрилат

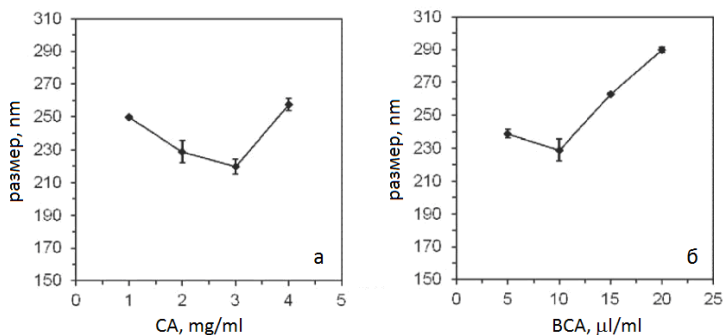
(ВСА) в присъствие на поллоксамер 188 и лимонена киселина (в качеството на фармацевтично приемлив подкисляващ агент) се получават монодисперсни частици с размери от 220 nm до 290 nm в зависимост от условията на получаване (Фиг. 1б). Разпределенията по размери, получени чрез измерване на суспензиите с динамично светоразсейване (DLS), съответстват на размерите от наблюденията със SEM.



Фиг. 1. а) Механизъм на анионната полимеризация на алкил-2-цианоакрилатите; б) PBCA наночастици получени при различни концентрации на бутилцианоакрилат (BCA) и лимонена киселина (CA): i) 10 μ l/ml BCA и 2,0 mg/ml CA; ii) 10 μ l/ml BCA и 4,0 mg/ml CA; iii) 20 μ l/ml BCA и 2.0 mg/ml CA; iv) разпределения по размери (по интензитет) определени чрез DLS анализ (Yordanov et al. 2016a).

Размерите на получените PBCA частици (<300 nm) са в типичния за цианоакрилатните частици интервал от 100 до 300 nm, които се считат за оптимални по отношение на приложението им като лекарствени носители за парентерално доставяне (Hillaireau and Couvreur 2009). При всички експерименти скоростта на разбъркване по време на получаването на частиците е постоянна (600 rpm), тъй

като от литературата е известно, че тя също влияе върху размера на получаващите се частици. Добивът на ПВСА частици (определен гравиметрично) е около 65-75%, тъй като част от получения полимер се отлага по бъркалката и стените на съдовете, а част от частиците агломерират и агрегатите се отстраняват при филтруването на дисперсията. Лимонената киселина (СА) беше избрана в качеството на подкисляващ агент, който позволява фин контрол на рН. В първата серия проведени експерименти, рН на полимеризационната среда се варира чрез промяна в концентрацията на СА при постоянна концентрация на мономер (ВСА; 10 $\mu\text{l/ml}$). Стойностите на рН на среда с концентрации на СА 1,0 mg/ml, 2,0 mg/ml, 3,0 mg/ml и 4,0 mg/ml са съответно 2,80, 2,57, 2,47 и 2,38. Средният размер на частиците намалява слабо, от 250 на 220 nm, с увеличаване на концентрацията на СА до 3,0 mg/ml, докато използването на по-високи концентрации на СА води до получаването на по-големи частици (Фиг. 2а).



Фиг. 2. Зависимост на средния размер на ПВСА частиците от концентрацията на: а) лимонена киселина (СА); б) мономер (ВСА) в полимеризационната среда. Индексът на полидисперсност (PDI) е $\leq 0,08$ (Yordanov et al. 2016a).

Най-малките частици (220–230 nm) при изследваните условия бяха получени при концентрации на СА от 2,0–3,0 mg/ml ($\text{pH} \approx 2,5$). Добивът на частици, определен гравиметрично, намалява от 75% до 55% при повишаване концентрацията на СА от 1,0 до 3,0 mg/ml. Концентрация на СА от 2,0 mg/ml беше избрана за оптимална при провеждане на изследванията за определяне ефекта на ВСА концентрацията. Ефектът на рН върху образуването на наночастици от ПВСА е сложен и свързан с ефекта на рН върху молекулната маса и молекулно-масовото разпределение на получаващия се полимер. Предишни проучвания (с използване на декстран 70 като стабилизатор и солна киселина като подкисляващ агент) също са показали

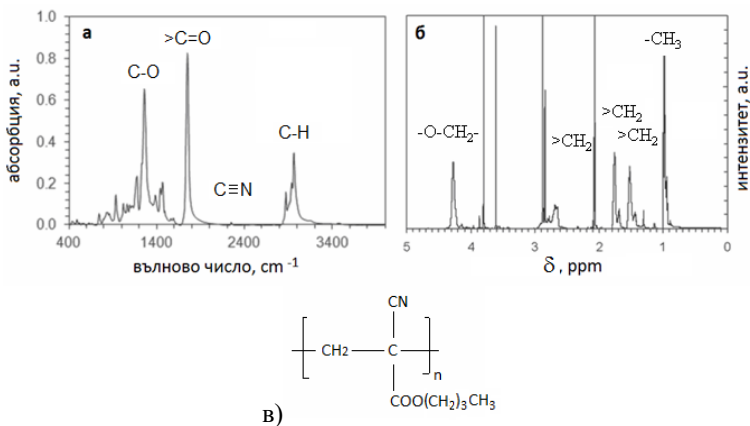
минимум в размера на частиците като функция на рН на полимеризационната среда (Douglas et al. 1984). В прекалено кисела среда ($\text{pH} < 2$) полимеризацията протича относително бавно и се получават полутечни и слепващи се частици, което вероятно е причината за получаване на по-големи частици. При по-високи стойности на рН (> 3) също се получават по-големи и слепващи се частици, вероятно поради високата концентрация на инициатор на полимеризацията (OH^- йони) и получаване на олигомери с много ниска молекулна маса.

Бяха проведени експерименти по получаване на ПВСА частици при различни концентрации на мономер (ВСА) и постоянна концентрация на СА от 2,0 mg/ml. Средният размер на частиците се увеличава от 230-240 nm до 290 nm при увеличаване на ВСА концентрацията от 10,0 до 20,0 $\mu\text{l/ml}$ (Фиг. 2б). Предишни проучвания (с използване на декстран 70 като стабилизатор и солна киселина като подкисляващ агент) са показали сложна зависимост на размера на частиците от концентрацията на мономера. Освен това, известни са изследвания, които показват, че увеличаването на концентрацията на мономера води до увеличаване броя на частиците, но не и на крайния им размер (Alonso et al., 1990). Всички тези резултати показват, че малки промени в протокола за получаване на частиците и вероятно качествата на изходния мономер водят до получаване на различни резултати от различните изследователски групи. При нашите експерименти добивът на частици не зависи съществено от концентрацията на ВСА и е около 65-75%. Частиците, получени при концентрации на СА и ВСА, съответно 2,0 mg/ml и 10 $\mu\text{l/ml}$, бяха използвани за допълнително структурно охарактеризиране и изследване на цитотоксичността. Тези частици са със среден размер 230 nm, с тясно разпределение по размери ($\text{PDI} \leq 0,08$) и M_w 2200 (PDI 1.3).

Охарактеризирането на ПВСА чрез ИЧ (FTIR) и ЯМР ($^1\text{H-NMR}$) спектроскопия потвърждава структурата и чистотата на получения полимер. FTIR спектърът на ПВСА (Фиг. 3а) показва абсорбционни ивици за естерна карбонилна група $\text{C}=\text{O}$ (1752 cm^{-1}), нитрилна група $\text{C}\equiv\text{N}$ (2255 cm^{-1}), C-H ($2884-2965 \text{ cm}^{-1}$) и C-O (1257 cm^{-1}). Отсъствието на абсорбционна ивица за винилни C-H and $\text{C}=\text{C}$ връзки (които се наблюдават съответно при 3130 cm^{-1} и 1620 cm^{-1} в спектъра на ВСА) показва, че полимеризацията на мономера е пълна и не може да бъде детектиран неполимеризирал мономер.

Анализът с $^1\text{H-NMR}$ показва сигнали за метиленови протони при δ 1,5 (2H), 1,7 (2H), 2,9 (2H) и 4.3 ppm (2H), докато сигналът при δ 1,0 ppm (3H) е от метилови протони (Фиг. 3б). Сигналът при δ 2,05 е от използвания разтворител, ацетон- d_6 . Дзета-потенциалът на ПВСА

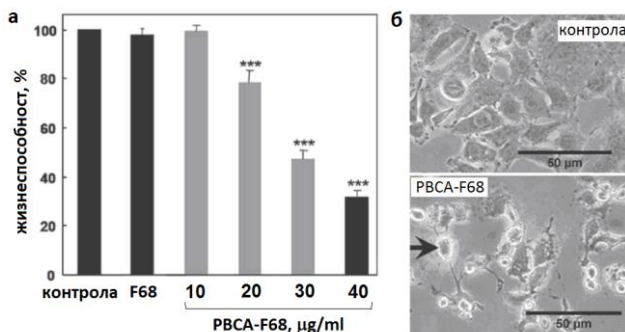
частиците във фосфатен буфер (pH 7,4) е отрицателен ($-4,5 \pm 1,5$) mV. Отрицателният дзета-потенциал при ПВСА частиците се отдава на свободни карбоксилни групи от полимера по повърхността на частиците (Arias et al. 2008) и/или адсорбция на аниони (Douglas et al. 1986). Електростатичната стабилизация на колоидните системи като цяло е значителна при абсолютни стойности на дзета-потенциала около и над 30 mV. Стабилността на ПВСА дисперсиите при измерените ниски стойности се обяснява чрез стеричната стабилизация на колоида от използвания стабилизатор, полуксамер 188, който чрез адсорбцията си върху повърхността на частиците възпрепятства тяхната агломерация в дисперсията. Измерванията на дзета-потенциала са важна част от охарактеризирането на колоидните системи за лекарствено доставяне, тъй като дзета-потенциалът е определящ за адсорбцията на протеини и други биомолекули, в това число и биологичноактивни субстанции. От друга страна, адсорбцията на протеини върху колоидните системи за лекарствено доставяне е главен фактор, определящ фармакокинетиката на колоидните лекарствени форми за парентерално приложение (Sahay et al. 2010).



Фиг. 3. а) FTIR спектър на ПВСА (в KBr); б) ^1H -NMR спектър на ПВСА, измерен в ацетон- d_6 (Yordanov et al. 2016a); в) структура на ПВСА.

Токсичният ефект на получените ПВСА наночастици е изследван върху карциномни HeLa клетки с МТТ метод, при което е установена дозозависима цитотоксичност (Фиг. 4а). Инхибиторната концентрация (IC_{50}), при която се наблюдава 50% клетъчна жизнеспособност (при третиране за 24 ч) е 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Само 30% от клетките остават

жизнеспособни при концентрации на ПВСА от 40 $\mu\text{g/ml}$, при която се наблюдават морфологични изменения (в това число ядрена фрагментация) в третираните клетки, асоциирани с настъпваща апоптоза (Фиг. 4б). Следва да се отбележи, че използваният сърфактант (F68) при тези концентрации на ПВСА (40 $\mu\text{g/ml}$) е с концентрация 4 $\mu\text{g/ml}$, при която самостоятелно не проявява цитотоксичен ефект. Предишни проучвания са показали, че реакционната среда, т.е. дисперсната среда след провеждане на полимеризацията на цианоакрилати проявява токсичност при опити с мишки, в които е установена летална доза $\text{LD}_{50}=33,4 \text{ ml/kg}$ (Kante et al. 1982). При нашите проучвания, наночастиците са отделени от полимеризационната среда след получаването им (чрез центрофугиране и ултразвуково редиспергиране в 0,05% F68 в PBS буфер) с цел да бъде установен цитотоксичният ефект на частиците, неповлиян от евентуална токсичност на полимеризационната среда.



Фиг. 4. а) Жизнеспособност на HeLa клетки третираны с различни концентрации ПВСА наночастици (10-40 $\mu\text{g/ml}$) за 24 ч ($\pm\text{SEM}$, *** $p<0,001$ спрямо контролата). Концентрацията на полуксамер в контролната проба е 4 $\mu\text{g/ml}$; б) Микрофотографии на контролни (нетретираны) HeLa клетки и такива, третираны с ПВСА-F68 (40 $\mu\text{g/ml}$) за 6 ч (Yordanov et al. 2016a).

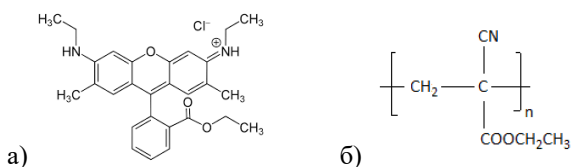
Предишни проучвания върху токсичността на наночастици от ПВСА при нормални (неракови) клетки са показали по-ниска цитотоксична концентрация, например между 75 $\mu\text{g/ml}$ и 150 $\mu\text{g/ml}$ при нормални хепатоциты (Kante et al. 1982). При проучвания върху клетки от нормален корнеален епител (SIRC) не беше установено цитотоксично действие при концентрации на ПВСА до 40 $\mu\text{g/ml}$ (данните не са показаны тук), който резултат може да се окаже важен за евентуално приложение на ПВСА наноносителите като компо-

ненти на препарати за очно приложение. Конкретните причини за различната цитотоксичност на наночастиците по отношение на различните клетъчни линии остават неизяснени.

Флуоресцентно маркирани PECA наночастици

Приложенията на полимерни колоидни частици като системи за лекарствено доставяне изисква детайлно разбиране на взаимодействията на тези частици с живи клетки, механизмите на проникване на частиците в клетките и вътреклетъчната им локализация. Флуоресцентното маркиране на тези частици позволява визуализирането им чрез флуоресцентен микроскоп при биомедицински експерименти. Например, чрез флуоресцентно маркиране на наночастици е установен механизмът на преминаването им през кръвно-мозъчната бариера (Kreuter et al. 1995) и проникването им в кожата (Miyazaki et al. 2003).

Целта на проведените от нас експерименти е да бъдат получени колоидни частици от поли(етилцианоакрилат) (PECA) с включен в тях флуорофор, Родамин 6G (Фиг. 5), и да бъдат установени ефектите от включването на флуорофора върху физикохимичните свойства на частиците. Поради относително липофилния си характер, Родамин 6G е използван като маркер за липиди и липофилни полимери (Wang et al. 2005), полистиренови латексни частици (Charreyre et al. 1995) и частици от поли(метилметакрилат) (Nagao et al. 2006).

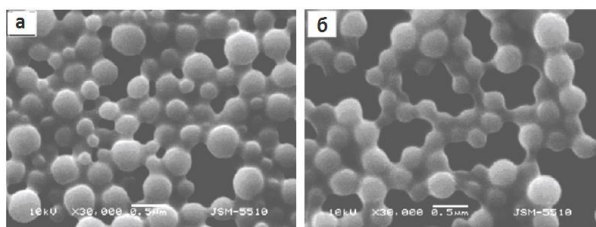


Фиг. 5. Структури на: а) Родамин 6G (R6G); б) PECA.

Частиците R6G-PECA бяха получени чрез емулсионна полимеризация на етилцианоакрилат (ECA) в солнокисела водна среда, съдържаща полноксамер 188 и Родамин 6G. Тъй като PECA е относително хидрофобен полимер, вграждането на липофилното багрило R6G по време на емулсионна полимеризация при проведените от нас експерименти се оказва успешно. Бяха изучени ефектите на концентрацията на багрилото и мономера в полимеризационната среда върху физикохимичните и оптичните свойства на частиците. Изследвани бяха също ефективността на включване на R6G в PECA частиците и фото-

обезцветяването на маркираните частици при облъчване с ултравиолетова (УВ; $\lambda=365$ nm) светлина, като по такъв начин са очертани оптималните експериментални условия за получаване на флуоресцентно маркирани PECA частици.

Електронните микрофотографии, направени със сканиращ електронен микроскоп (SEM) показват, че PECA и маркираните с багрило частици (R6G-PECA) са сферични, с размери съответно около 400-500 и 200-300 nm (Фиг. 6). Очевидно е, че присъствието на Родамин 6G в полимеризационната среда, дори при използваните ниски концентрации ($6,0 \cdot 10^{-5}$ M), оказва измеримо влияние върху размера на получаващите се частици. Анализите с динамично светоразсейване (DLS) показват размери, подобни на тези от наблюденията със SEM. Средните размери и при двата вида частици (R6G-PECA и PECA) не зависят значително от концентрацията на мономер в полимеризационната среда (Таблица 1).



Фиг. 6. SEM микрофотографии на частици: а) PECA; б) R6G-PECA частици. Частиците са получени при концентрация на ECA $7,5 \mu\text{l/ml}$. Концентрацията на R6G в полимеризационната среда при получаването на R6G-PECA е $6,0 \cdot 10^{-5}$ M (Yordanov and Bedzhova 2011).

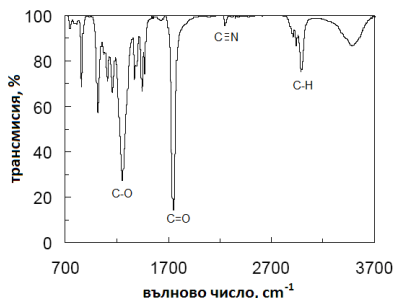
Всички получени частици са с малък отрицателен дзета-потенциал във физиологичен фосфатен буфер при pH 7,4 в присъствие на $0,137$ M NaCl (Таблица 1). Отрицателният знак на дзета-потенциала вероятно е резултат от наличието на частично йонизирани карбоксилни групи по повърхността на частиците, а малката му стойност се определя от относително голямата йонна сила на средата. Въпреки малкия дзета-потенциал, дисперсиите са хомогенни и стабилни поради стабилизация на колоида от адсорбираните по повърхността на частиците молекули на стабилизатора полуксамер 188 (Pluronic F68). Слабо отрицателни стойности на дзета-потенциала са характерни за PASA наночастиците в дисперсии стабилизирани с нейногенни сърфактанти и в този конкретен случай, включеният в частиците флуорофор не повлиява съществено тази тяхна характеристика, което

е важна предпоставка за използването му като флуоресцентен маркер на този тип частици (маркерът не трябва да повлиява съществено повърхностните характеристики на частиците, тъй като именно от тези характеристики до голяма степен зависят взаимодействията им с различни биомолекули и клетки).

Таблица 1. Среден размер (определен чрез DLS, разпределение на размерите по интензитет) и дзета-потенциал на PECA и R6G-PECA частици, получени при различни концентрации на ECA и R6G. Измерванията на дзета-потенциала са проведени във физиологичен фосфатен буфер при pH=7,4 и 0,137 M NaCl (Yordanov and Bedzhova 2011).

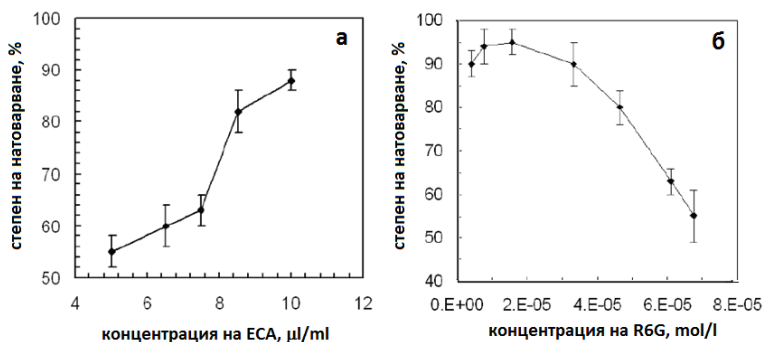
частици	[ECA], $\mu\text{L mL}^{-1}$	[R6G], M	размер, nm	дзета- потенциал mV
PECA	5.0	-	430 ± 25	-2.7 ± 0.4
	6.5	-	438 ± 14	-3.4 ± 0.2
	7.5	-	534 ± 17	-3.1 ± 0.3
	8.5	-	405 ± 23	-2.8 ± 0.2
R6G-PECA	5.0	6.0×10^{-6}	250 ± 15	-2.2 ± 0.4
	6.5	6.0×10^{-6}	250 ± 7	-2.5 ± 0.4
	7.5	6.0×10^{-6}	337 ± 15	-2.3 ± 0.4
	8.5	6.0×10^{-6}	288 ± 11	-2.0 ± 0.1
	7.5	2.0×10^{-6}	420 ± 26	-2.0 ± 0.2
	7.5	4.5×10^{-6}	350 ± 20	-1.4 ± 0.5
	7.5	1.0×10^{-4}	320 ± 15	-2.2 ± 0.1

ИЧ (FTIR) спектърът на PECA (Фиг. 7) показва характерични абсорбионни ивици за естерна карбонилна група C=O (1750 cm^{-1}), C \equiv N група (2251 cm^{-1}) и C-H връзки ($2890\text{-}3050 \text{ cm}^{-1}$). Широката ивица при 3490 cm^{-1} се приписва на O-H връзки. Спектърът на R6G-PECA (не е показан) е подобен, без забележими ивици на поглъщане от R6G поради ниската му концентрация в PECA частиците.

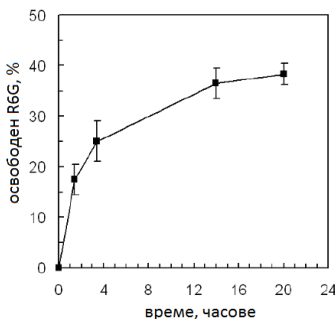


Фиг. 7. ИЧ спектър на PECA (Yordanov and Bedzhova 2011).

Изучени бяха ефектите на концентрациите на ECA и R6G в полимеризационната среда върху степента на натоварване на R6G. Повишаването концентрацията на ECA (в интервала 5,0-8,5 $\mu\text{L/ml}$) води до значително повишаване на степента на натоварване на R6G в частиците (Фиг. 8а). Концентрацията на ECA се явява важен параметър, определящ степента на натоварване на багрилото в частиците и получаването на частици с различно съдържание на R6G. Експериментите, при които се варира изходната концентрация на R6G при постоянна ECA концентрация показват, че частици с по-голямо R6G съдържание могат да бъдат получени при по-висока концентрация на R6G, но в този случай степента на натоварване е ниска, особено при R6G концентрации над $2,0 \cdot 10^{-5}$ M (Фиг. 8б).

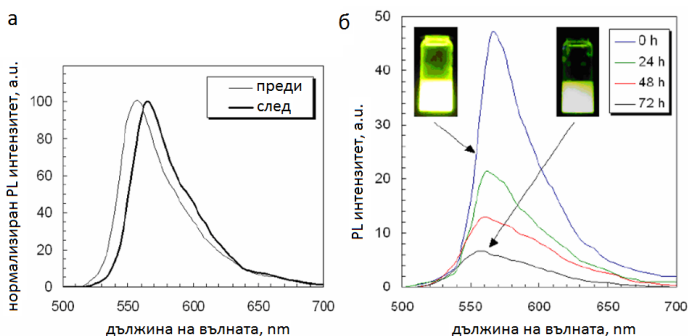


Фиг. 8. Степен на натоварване на R6G в PECA частици като функция на концентрацията на: а) ECA (при постоянна концентрация на R6G $6,0 \cdot 10^{-5}$ M); б) R6G (при концентрация на ECA $7,5 \mu\text{L/ml}$) (Yordanov and Bedzhova 2011).



Фиг. 9. Скорост на освобождаване на R6G от R6G-PECA частици с начално съдържание на R6G $5,5 \cdot 10^{-6}$ mmol/mgPECA (Yordanov and Bedzhova 2011).

Скоростта на освобождаване на R6G във физиологичен буфер (рН 7,4) е проследена за период от 22 часа (Фиг. 9). През този период частиците запазват своята колоидна стабилност, след което проявяват тенденция към седиментация. Отделянето на R6G през първите няколко часа е относително бавно. Освободеният (близо 40% от включения в частиците R6G) вероятно представляват молекули R6G, които са по-слабо асоциирани или адсорбирани по повърхността на частиците. Остатъкът от натоварения в частиците R6G остава трайно включен в частиците и освобождаването му е изключително бавно.



Фиг. 10. а) Флуоресцентни спектри на R6G преди и след вграждане в PECA частици (при концентрация $6,0 \cdot 10^{-5}$ M); б) Изменения във флуоресцентния спектър по време на UV-облъчване ($2,1 \text{ mW/cm}^2$) на водна дисперсия на R6G-PECA частици (Yordanov and Bedzhova 2011).

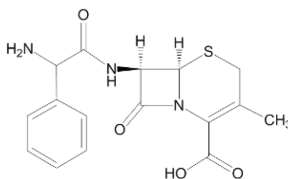
При вграждане на багрилото R6G в PECA частиците беше установено изменение във флуоресцентния спектър, който е отместен към по-дълговълновата част на спектъра при включеното в частиците багрило в сравнение с R6G в разтвора (Фиг. 10а). Може да се предположи, че този ефект е в резултат на агрегиране на молекулите на флуорофора при включването им в частиците и/или промяна в свойствата на средата. Стабилността на флуоресценцията на R6G-PECA частиците при облъчване с UV светлина (365 nm) е илюстрирана на Фиг. 10б. Интензитетът на флуоресценцията намалява с времето на облъчване, при което пикът се измества леко към по-късовълновата част на спектъра, което е резултат от химическа трансформация на R6G. Този процес на фотообезцветяване и загуба на флуоресценцията е бавен и протича в рамките на часове и дни на облъчване, което не

намалява потенциала за използване на тези частици в биологични експерименти.

РАСА наночастици като носители на антибиотици

РЕСА наночастици като носители на цефалексин

Цефалексинът (СРХ) е цефалоспоринов антибиотик (Фиг. 11), който намира приложение при третиране на различни бактериални инфекции, в това число инфекции на кожата и меките тъкани, проявявайки активност предимно към грам-положителни бактерии. Антибиотиците от този тип проникват, но не се акумулират във фагоцитите, вероятно поради техния киселинен характер (Tulkens 1991).

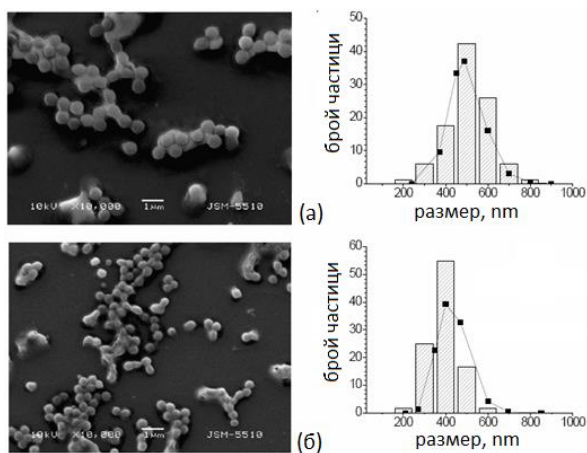


Фиг. 11. Структура на цефалексин (СРХ).

Мотивът за създаване на РАСА-базирани формулировки на цефалексин се основава на известни от литературата успешни формулировки на β -лактамни антибиотици с РАСА наночастици, които са показали повишена антибиотична активност при вътреклетъчни инфекции (Gulyaev et al. 1998; Pinto-Alphandary 2000). Тествани бяха два различни метода за натоварване на цефалексина в РЕСА частиците – чрез адсорбция върху предварително получени частици и чрез включване на антибиотика в частиците по време на тяхното получаване. Полимеризацията на ЕСА е проведена в солнокисел воден разтвор на полноксамер 188 и СРХ. Изучени са ефектите на концентрациите на СРХ и ЕСА върху размера на частиците и степента на лекарствено натоварване. Установено беше, че адсорбцията на цефалексин върху предварително получени частици протича с ефективност от само 1-2%, поради което изследванията бяха насочени към изучаване на лекарственото натоварване по време на полимеризация.

Наблюдението на получените колоиди чрез SEM показва субмикронни РЕСА и СРХ-РЕСА частици (Фиг. 12). Разпределенията по размери, получени чрез DLS съответстват на тези от SEM наблюдение.

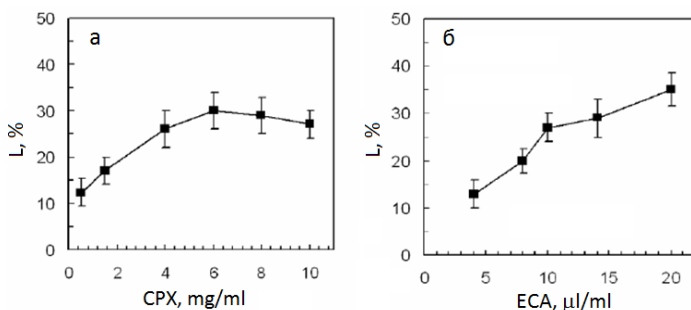
нията, при което CPX-PECA частиците са по-малки (~430 nm) от PECA частиците (~550 nm).



Фиг. 12. SEM изображения (вляво) и разпределения по размери определени чрез DLS (непрекъснатата линия) и SEM (стълбове) (вдясно) на: а) PECA, и б) CPX-PECA частици. Частиците са приготвени при концентрации на ECA и CPX от 10 mg/ml (Yordanov 2012b).

Ефектът на CPX върху процеса на образуване на частиците се забелязва визуално: дисперсиите съдържащи CPX стават млечно бели след добавяне на мономера по-бързо, отколкото тези без добавен антибиотик. Установява се, че изменения в концентрациите на мономера (в интервала 4-12 $\mu\text{L/ml}$; при постоянна CPX концентрация от 2 mg/ml) и CPX (0,5-10 mg/ml; при постоянна концентрация на ECA от 10 $\mu\text{L/ml}$) не оказват съществено влияние върху разпределенията по размер на получените CPX-PECA частици. Натоварените с антибиотик частици са с относително голям размер, 300-500 nm, който е от значение за насочването към целевите фагоцитиращи клетки и дава възможност за доставка на по-големи количества лекарствено вещество. Следва да се отбележи, че се установява партидна вариация в качествата на изходния мономер и съответно на получените частици, поради което сериите от експерименти с различни мономерни и лекарствени концентрации са провеждани с мономер от една и съща партида. Полимеризацията на ECA в присъствие на CPX води до получаването на CPX-PECA колоидни частици с различна степен на лекарствено натоварване в зависимост от концентрациите на ECA и

СРХ (Фиг. 13). Степента на лекарствено натоварване в частиците се увеличава от 10 до 30% с увеличаване концентрацията на СРХ от 0,5 до 6,0 mg/ml. Експериментите при по-висока концентрация на СРХ (>10 mg/ml) са ограничени поради ограничената разтворимост на цефалексина във фосфатен буфер (каквото се добавя след получаването на частиците). При втората серия експерименти концентрацията на СРХ е постоянна (2 mg/ml), докато концентрацията на ЕСА се увеличава от 4 до 20 $\mu\text{l/ml}$, при което степента на лекарствено натоварване в частиците се увеличава от 10 до 30%. Използването на по-високи концентрации на ЕСА се ограничава от получаването на макроскопски агрегати от полимер.

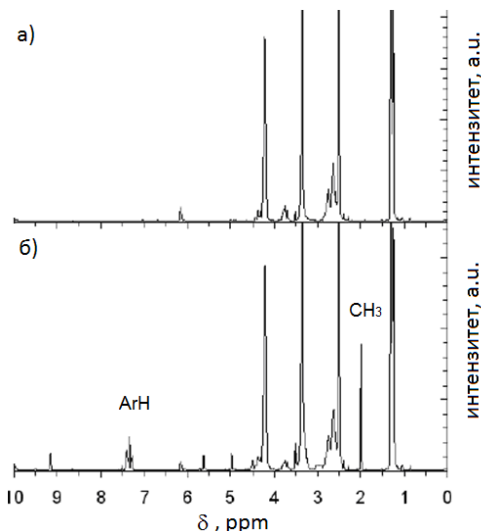


Фиг. 13. Зависимост на степента на лекарствено натоварване от концентрациите на: а) СРХ (при ЕСА концентрация от 10 $\mu\text{l/ml}$); б) ЕСА (при СРХ концентрация от 2 mg/ml) (Yordanov 2012b).

ЯМР (^1H NMR) спектрите на РЕСА и СРХ-РЕСА в DMSO- d_6 са показани на Фиг. 14. Сигналят при 2,49 ppm е от разтворителя, сигналите при 4,2 и 2,6 ppm съответстват на метиленови протони, а сигналят при 1,3 ppm – на метилови протони от РЕСА. В спектъра на СРХ-РЕСА се наблюдават сигнали от двата компонента, РЕСА и СРХ. Сигналят при 9,17 ppm се приписва на протон от амидната група CONH, а тези при 7,2-7,6 ppm – на ароматните протони от молекулата на СРХ. Сигналите при 2,8-3,1 ppm (2H) и 1,99 ppm (3H) съответстват на метиленови и метилови протони, а сигналите при 5,62 ppm (1H), 4,97 ppm (1H) и 4,49 ppm – на СН групи от СРХ. ЯМР спектърът на СРХ-РЕСА частиците може да бъде използван и за определяне съдържанието на цефалексин в частиците.

Дзета-потенциалите във физиологичен фосфатен буфер при pH 7,4 на РЕСА частиците са отрицателни, $-2,9 \pm 0,5$ mV. За разлика от тях обаче, дзета-потенциалите на СРХ-РЕСА частиците при същите

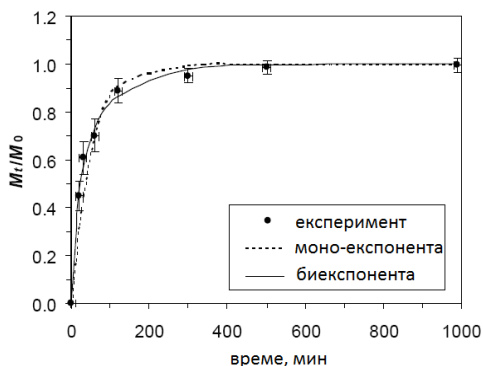
условия са слабо положителни, около $2,0 \pm 0,5$ mV, и не зависят съществено от концентрацията на CPX. Тези данни подкрепят хипотезата, че известна част от CPX е адсорбирана на повърхността на частиците, най-вероятно под катионна форма.



Фиг. 14. ЯМР (^1H NMR) спектри снети в DMSO- d_6 на: а) PECA, и б) CPX-PECA (с лекарствено съдържание 21%, w/w). CPX-PECA са приготвени при използване на 10 $\mu\text{L}/\text{ml}$ ECA и 10 mg/ml CPX (Yordanov 2012b).

Лекарственото освобождаване от CPX-PECA частиците е изследвано във физиологичен буфер с рН 7,4 при 37°C . Използвани са частици с високо лекарствено съдържание (21%), като периодично от дисперсията се взема проба, центрофугира се и се определя спектрофотометрично концентрацията на освободения цефалексин в дисперсната среда. За период от около 16 часа около 2,2 mg (от 2,7 mg) CPX могат да бъдат отделени от 13 mg CPX-PECA частици, като след този период частиците стават нестабилни и агрегират. При кинетичния анализ на профила на освобождаване са тествани различни класически модели (на Higuchi, Sinclair-Peppas и Baker-Lonsdale), но данните най-добре се описват от емпирични експоненциални модели (Фиг. 15). Освобождаването на натоварения в PECA частици CPX протича най-вероятно чрез дифузия на включените в полимера лекарствени молекули и десорбцията им от повърхността на частиците, като молекулите, които са здраво асоциирани с полимера и/или вгра-

дени във вътрешността на частиците, вероятно се освобождават при ерозия на частиците чрез хидролиза на естерните връзки в полимера.



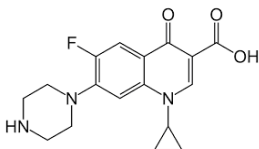
Фиг. 15. Профил на освобождаване на цефалексин включен в РЕСА частици. Експерименталните точки (●) са напаснати с моно- и биэкспоненциален емпиричен модел на освобождаване (Yordanov 2012b).

Биэкспоненциалният модел пасва по-добре на експерименталните данни ($R^2=0,997$), при който процесът на освобождаване на лекарството се разделя условно на «бърз» и «бавен» етап със скоростни константи съответно $0,068$ и $0,011 \text{ min}^{-1}$. В действителност обаче съществуването на два различни физични процеса на освобождаване следва да се разглежда с известен скептицизъм, тъй като предишни моделни изследвания са показали, че скоростта на лекарствено освобождаване от колоидни носители с логнормално разпределение по размери показва профил, които силно наподобява двуетапен процес, при който «бързото» освобождаване може да е резултат от отделяне на лекарство от повърхността на частиците и лекарство, включено в малките частици, докато «бавният» етап да се дължи на отделяне на лекарство, включено в големите частици (Washington 1990).

РВСА наночастици като носители на ципрофлоксацин

Ципрофлоксацинът (CIP; Фиг. 16) е флуорохинолонов антибиотик с активност по отношение на различни клинично значими микроорганизми. От научната литература са известни формулировки с ципрофлоксацин на основата на наночастици от албумин (Kumar and Jain 2007), поли(D,L-млечна-съ-глицолова киселина) (Dillen et al. 2004; Dillen et al. 2006; Jeong et al. 2008), поли(изохексилцианоакри-

лат) (PBCA) (Fawaz et al. 1997; Fawaz et al. 1998; Page-Clisson et al. 1998; Page-Clisson et al. 1998a) и поли(етилбутилцианоакрилат) (PEBCA) (Page-Clisson et al. 1998).

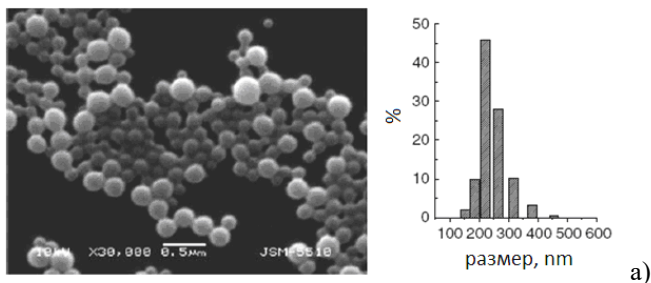


Фиг. 16. Структура на ципрофлоксацин (CIP)

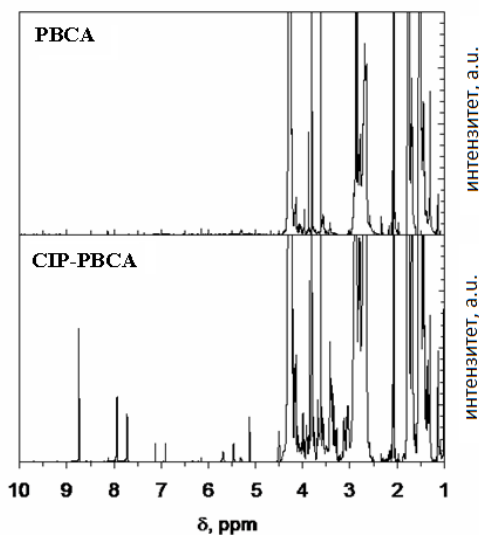
При нашите опити CIP беше успешно включен в наночастици от PBCA чрез емулсионна полимеризация в присъствие на стабилизатор полоксамер 188 и лимонена киселина, без да се използва ацетон. При предишни изследвания върху вкграждането на CIP в PBCA частици чрез дисперсионна полимеризация е използван декстран 70 (Fawaz et al. 1997; Fawaz et al. 1998), а включването на CIP в PEBCA е било възможно само в присъствие на ацетон (30%, v/v) (Page-Clisson et al. 1998). Наши опити с вграждане на CIP в PBCA частици чрез дисперсионна полимеризация в присъствие на декстран 40 не доведоха до стабилни дисперсии, но използването на стабилизатора полоксамер 188 в присъствие на лимонена киселина позволява получаване на стабилни частици без използване на ацетон.

Наблюденията чрез SEM показват, че получените от нас CIP-PBCA частици са сферични, с размери около 240 nm (Фиг. 17). Частиците PBCA, получени при еднакви други условия, но в отсъствие на ципрофлоксацин, са по-малки, около 170 nm. Присъствието на CIP в полимеризационната среда оказва влияние не само върху размера на частиците, но и върху молекулно-масовото разпределение на получения полимер. Молекулната маса при PBCA (определена с GPC) е M_w 2200 (PDI 1,3), докато при CIP-PBCA е около M_w 860 (PDI 1,1). Следва да се отбележи, че известна част от мономера не се включва в състава на получените наночастици, като добивът на PBCA е около 70%.

Вграждането на CIP в наночастиците PBCA е потвърдено също така чрез изолиране на частиците, разтварянето им в ацетон-d6 и анализ с ЯМР (^1H NMR) спектроскопия (Фиг. 17б). Присъствието на CIP във формулировката се установява по характерните за него сигнали от ароматни протони при 8,74 ppm (1H, s), 7,94 ppm (1H, d, J 13,27 Hz) и 7,72 ppm (1H, d, J 7,30 Hz).



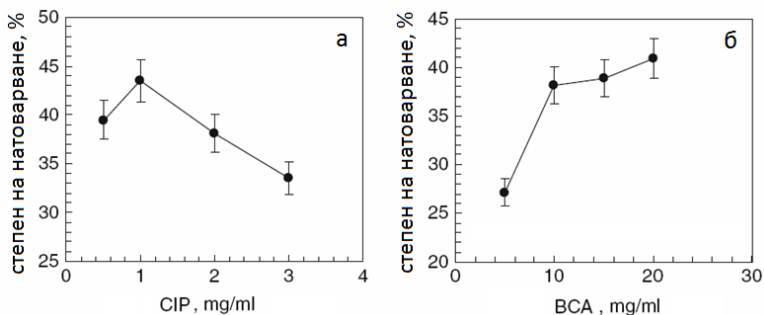
а)



б)

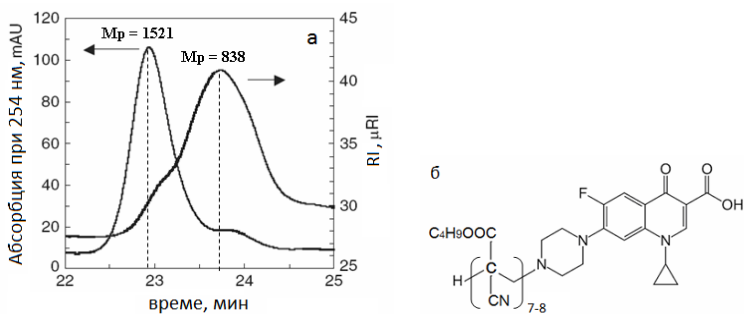
Фиг. 17. а) SEM изображения (ляво) и разпределение по размери от DLS (дясно) на CIP-PBCA частици (Yordanov et al. 2010c); б) ¹H-NMR спектри на PBCA и CIP-PBCA измерени в ацетон-d₆.

Ефектът на концентрацията на CIP в полимеризационната среда върху степента на лекарствено натоварване в частиците е показано на Фиг. 18. При повишаване концентрацията на CIP степента на лекарствено натоварване намалява (при постоянна концентрация на BSA от 10 mg/ml). От друга страна, повишаването концентрацията на BSA в полимеризационната среда (при постоянна концентрация на CIP от 2 mg/ml) води до по-висока степен на лекарствено натоварване. Като оптимална CIP-PBCA формулировка е приета тази, получена при концентрации на CIP и BSA съответно 3 и 10 mg/ml.



Фиг. 18. Степен на натоварване на CIP в PVCBA наночастици като функция на концентрацията на: а) CIP (при концентрация на BCA от 10 mg/ml), и б) BCA (при концентрация на CIP от 2 mg/ml) (Yordanov et al. 2010c).

Някои CIP молекули е възможно да са модифицирани от присъединени към тях цианоакрилатни остатъци, което съответства на данните от GPC анализа (Фиг. 19а). Ковалентното свързване между PVCBA и CIP (Фиг. 19б) може да се осъществи в случай, че CIP инициира цвитерйонна полимеризация на BCA чрез вторичната аминогрупа от пиперазиновия пръстен.

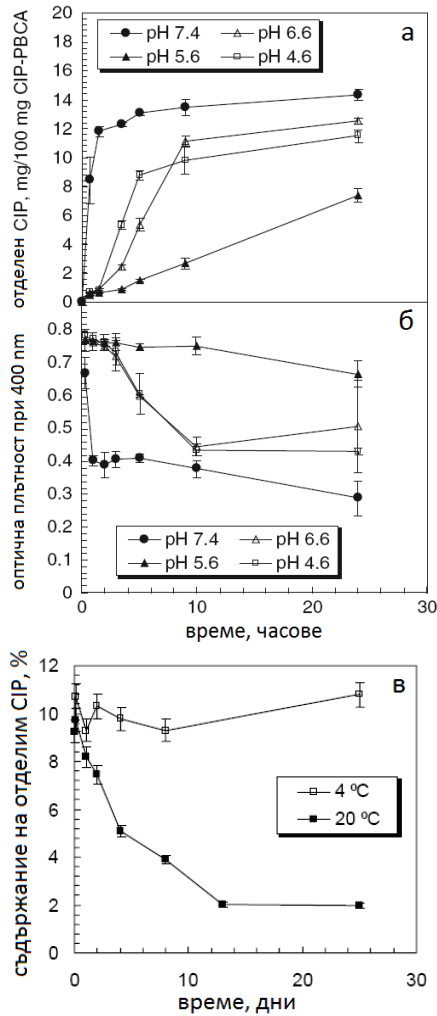


Фиг. 19. а) GPC хроматограми на CIP-PVCBA, получени с UV- и RI-детектори. От хроматограмата получена с IR детектор се забелязва преобладаваща нискомолекулна олигомерна фракция (n~5-6). Наличието на по-високомолекулна фракция, абсорбираща UV-светлина (254 nm) предполага наличие на CIP, свързан с PVCBA (n~7-8) (Yordanov et al. 2010c). б) предполагаема структура на CIP конюгиран с PVCBA.

Тъй като наночастиците, натоварени с антибиотици, обикновено са предназначени за лизозомно доставяне (след фагоцитоза от макрофагите), от особена важност е да се получат данни за скоростта на

лекарствено освобождаване при различни стойности на рН между 7,4 (рН на кръвта) и 4,6 (приблизителното рН във фаголизозомите). За целта, освобождаването на СІР от РВСА частиците е проследено спектрофотометрично (след построяване на калибровъчни прави за всяка една стойност на рН, при която е изследвано освобождаването) в дисперсната среда (след отстраняване на частиците чрез центрофугиране), като паралелно е измервана и оптичната плътност на дисперсията (Фиг. 20). Ципрофлоксацинът се освобождава най-бързо при рН 7,4 и най-бавно при рН 5,6 (Фиг. 20а). В същото време, ерозията на частиците (проследявана индиректно по намаляването на оптичната плътност на дисперсията) е най-бърза при рН 7,4 и най-забавена при рН 5,6 (Фиг. 20б). Вероятно ерозията на частиците е вероятно в резултат на хидролиза на естерните връзки в РВСА (Vezin and Florence 1980; Lenaerts et al. 1984; Muller et al. 1990). Най-бавното освобождаване при рН 5,6 съответства на най-бавна скорост на ерозия. Трябва също така да се има предвид, че при различните стойности на рН лекарствените молекули са в под различна форма, което се дължи на едновременното наличие на amino и карбоксилна групи в молекулата на ципрофлоксацина. В кисели разтвори ципрофлоксацинът е под формата на катион, в неутрални е под формата на цвитерйон, а в алкална среда – под формата на анион (Jalil et al. 2015).

Известна част (<30%) от СІР остава здраво асоциирана с частиците и не се освобождава за период от 24 часа, като подобни резултати са били получени преди това от други автори при вграждане на СІР в наночастици (Page-Clisson et al. 1998). Ненатоварените с лекарство РВСА наночастици се оказват по-стабилни по отношение на ерозия при същите условия. Например, ерозията на РВСА частици се забелязва едва след 10 часа в РBS буфер при 37°C и рН 7,4. Това вероятно е свързано с по-голямата молекулна маса в случая на РВСА в сравнение с СІР-РВСА (по-малката молекулна маса при СІР-РВСА частиците ги прави по-нестабилни и по-лесно ерозивни). Предварителни проучвания на антибактериалната активност на СІР-РВСА частиците, сравнявайки я с тази на СІР и РВСА частици върху клиничен изолат на щам от *Escherichia coli* в суспензия *in vitro*, показват практически еднаква минимална инхибиторна концентрация на ципрофлоксацина от 0,011 mg/ml. Ненатоварените с лекарство РВСА частици не проявяват антибактериално действие при изследваните концентрации (до 10 mg/ml).

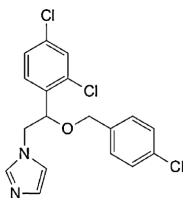


Фиг. 20. а) Профили на освобождаване на CIP от CIP-PVCA наночастици във физиологичен буфер при 37°C при различно pH; б) Изменение на оптичната плътност на дисперсиите на CIP-PVCA по време на освобождаването на CIP. Използваните CIP-PVCA частици са с размер 240 nm и концентрация в изследваната среда 0,12 mg/ml; в) (Yordanov et al. 2010c). в) Съдържание на отделен CIP като функция на времето на съхранение на CIP-PVCA при различни температури (Yordanov et al. 2010d).

Установено е, че съхранението на СІР-РВСА наночастиците при различни температури оказва влияние на лекарственото съдържание в частиците (Фиг. 20в). Частици СІР-РВСА, съхранявани при рН 5,6 и температура 20°С, ерозират и намаляват размера си (установено от наблюдения с SEM, турбидиметрични измервания и гравиметрично определяне количеството на изолираните с центрофугиране частици), при което около 80% от натовареният в тях отделен ципрофлоксацин се отделя от носителя за период от 25 дни. Съхраняваните при 4°С частици обаче не ерозират и включеният в тях ципрофлоксацин остава непроменен за същия период от 25 дни. Следва да се отбележи, че след 10 дни съхранение на СІР-РВСА при 4°С се наблюдава образуването на седимент, който е лесно редиспергируем при разбъркване и поставяне на дисперсията при стайна температура. Всички изследвани дисперсии остават колоидно стабилни за периода на съхранение от 25 дни.

РВСА наночастици като носители на еконазол

Еконазолът (ECN) е класически антимиотик от имидазолов тип, което проявява действие и спрямо някои грам-положителни бактерии (Фиг. 21).

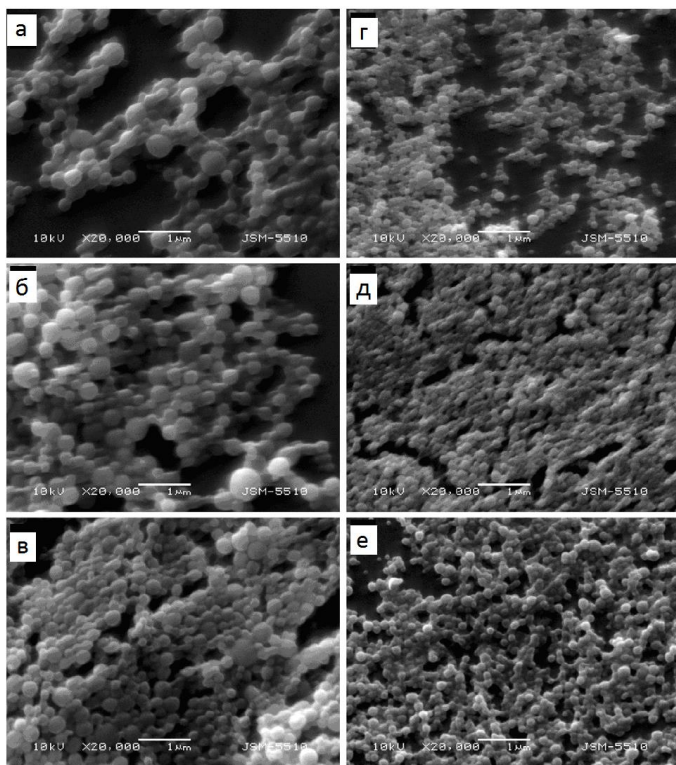


Фиг. 21. Структура на еконазол (ECN).

Колоидните формулировки на ECN, представени тук, са на основата на наночастици от РВСА и са получени по два различни метода: емулсионна полимеризация и нанопреципитация, използвайки три различни стабилизатора: декстран 40, полуксамер 188 и полисорбат 80. За целта, ECN се разтваря в ацетон, заедно с ВСА или РВСА, и се прибавя на капки при интензивно разбъркване към водна среда, съдържаща съответния колоиден стабилизатор.

Всички получени ECN-РВСА наночастици са с размери <250 nm (Фиг. 22). Анализите с DLS показват размери, съответстващи на изображенията, получени чрез SEM. Частиците, получени чрез полимеризация във всички случаи са по-малки (110-120 nm) от получените

чрез нанопреципитация (220-230 nm), без да се установява значим ефект върху размера от вида на използвания стабилизатор.



Фиг. 22. SEM изображения на ECN-PVCA наночастици получени чрез нанопреципитация (а, б, в) и полимеризация (г, д, е), използвайки като стабилизатори декстран 40 (а, г), полуксамер 188 (б, д) и полисорбат 80 (в, е) (Yordanov 2012).

От данните за различните ECN-PVCA наночастици, представени в Таблица 2, става ясно, че видът на колоидния стабилизатор оказва известно влияние върху абсолютната стойност на дзета-потенциалите (но не и методът на получаване), които са отрицателни при частиците, стабилизирани с декстран (D40) и полисорбат (P80), и са близо до нулата при частиците с полуксамер 188 (P188). Въпреки много малките абсолютни стойности на дзета-потенциала, колоидните дисперсии на ECN-PVCA частиците са стабилни, което може да се отдаде на стерична стабилизация.

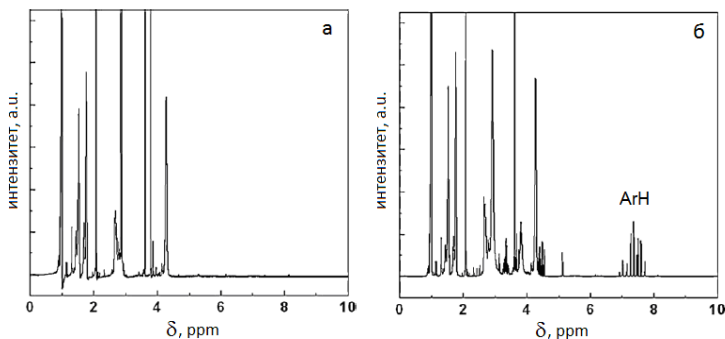
Таблица 2. Размери, индекс на полидисперсност (PDI) и дзета-потенциали на различни ECN-PBCA наночастици, определени чрез DLS измервания при 25°C. Дзета-потенциалите са измерени във фосфатен буфер с йонна сила 16,5 mM, проводимост 2,0 mS/cm и pH 7,4.

стабилизатор	среден размер, nm	PDI	дзета-потенциал mV
D40 ^a	121 ± 3	0.12 ± 0.01	-3.3 ± 0.5
P188 ^a	124 ± 3	0.10 ± 0.01	-0.2 ± 0.2
P80 ^a	111 ± 3	0.12 ± 0.02	-4.4 ± 0.6
D40 ^b	235 ± 4	0.15 ± 0.01	-3.2 ± 0.4
P188 ^b	230 ± 3	0.15 ± 0.01	-0.1 ± 0.7
P80 ^b	217 ± 4	0.15 ± 0.02	-4.5 ± 0.7

^a частици получени чрез полимеризация

^b частици, получени чрез нанопреципитация

Изследванията на ECN-PBCA чрез ЯМР (¹H-NMR) спектроскопия потвърждава включването на еконазола в частиците, а също така дава възможност и за неговото определяне спрямо количеството на PBCA. Спектрите, снети в ацетон-d₆, показват сигнали, характерни за ароматни протони (при 6.9 и 7.8 ppm) от молекулите на еконазола, които отсъстват в спектъра на PBCA (Фиг. 23).



Фиг. 23. ¹H-NMR спектри на: а) PBCA, и б) ECN-PBCA в разтворител ацетон-d₆ (Yordanov 2012).

Лекарственото съдържание и степента на лекарство натоварване при ECN-PBCA частиците, получени чрез полимеризация, е по-голямо (около 8,8–9,5%) в сравнение с това при частиците, получени чрез нанопреципитация (около 5,4–5,6%) (Таблица 3). Видът на използвания колоиден стабилизатор в случая не оказва съществено влияние върху включването на еконазола в PBCA частиците.

Таблица 3. Лекарствено съдържание (DC), степен на лекарствено натоварване (Le) и добив на различни ECN-PBCA наночастици (Yordanov 2012).

стабилизатор	DC (%)	Le (%)	добив (mg/ml)
D40 ^a	9.5 ± 0.2	61 ± 2	6.5 ± 0.1
P188 ^a	8.8 ± 0.2	64 ± 2	7.3 ± 0.3
P80 ^a	9.5 ± 0.1	66 ± 4	7.1 ± 0.3
D40 ^b	5.6 ± 0.1	52 ± 2	9.3 ± 0.3
P188 ^b	5.4 ± 0.1	49 ± 2	9.2 ± 0.1
P80 ^b	5.5 ± 0.3	50 ± 3	9.2 ± 0.1

^a частици получени чрез полимеризация

^b частици, получени чрез нанопреципитация

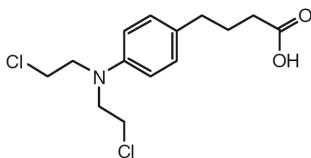
Добивът на наночастиците не зависи значително от използвания стабилизатор, но се определя основно от метода на получаване. Помалкият добив при частиците, получени чрез полимеризация, е вероятно резултат от непълното включване на изходния мономер в състава на частиците.

Наблюденията върху колоидната стабилност на получените ECN-PBCA формулировки показват, че дисперсиите с декстран 40 са относително по-нестабилни от останалите и агрегират при престояване за няколко дни при 4°C. Като цяло, частиците получени чрез нанопреципитация, са по-стабилни от тези, получени чрез полимеризация (които коагулират след няколко месеца съхранение при 4°C). Най-стабилните формулировки са получените чрез нанопреципитация в присъствие на полуксамер 188 и полисорбат 80. Тези дисперсии могат да бъдат съхранявани поне 6 месеца при 4°C без забележими промени в колоидната им стабилност.

PBCA наночастици като носители на цитостатици

PBCA наночастици натоварени с хлорамбуцил

Хлорамбуцилът (CHL, Фиг. 24) е липофилно противораково лекарство, което се използва клинично при левкози и някои напреднали солидни тумори. Той е класически алкилиращ агент и приложението му е ограничено отчасти поради малката му разтворимост във вода, химичната нестабилност и тежките нежелани реакции (Salmazo et al. 2007). Включването му в колоидни носители цели известно решаване на тези проблеми, като например формулирането му с липидни наночастици (Sharma et al. 2009).

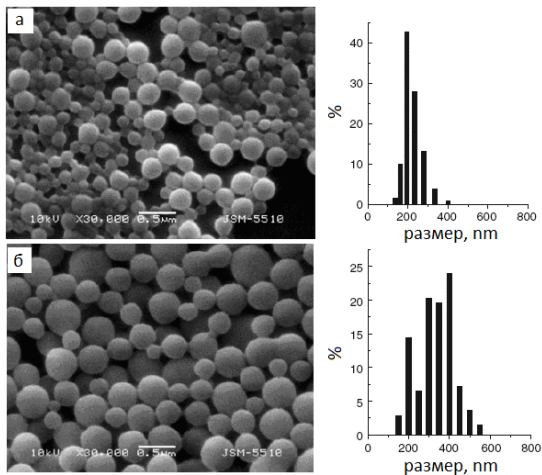


Фиг. 24. Структура на хлорамбуцил (CHL).

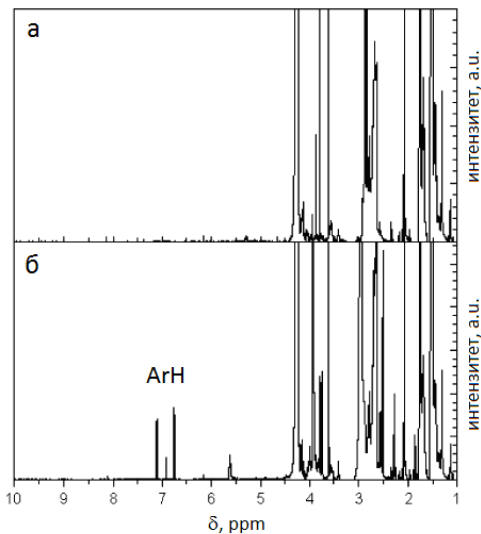
Получаване на CHL-РВСА наночастици чрез полимеризационен метод

Процедурата за получаване на CHL-РВСА формулировките при емулсионната и дисперсионната полимеризация включват разтваряне на мономера и хлорамбуцила в ацетон и контролирано прибавяне на този разтвор към полимеризационна среда, която е с кисел характер и съдържа подходящ колоиден стабилизатор (полоксамер 188 или декстран 40). Стабилизаторът полисорбат 80 не дава стабилни CHL-РВСА дисперсии в условията на емулсионна полимеризация. Получените CHL-РВСА частици чрез дисперсионна полимеризация в присъствие на декстран 40 са нестабилни, големи (400-500 nm) и с широко разпределение по размери. Най-стабилни дисперсии са получените в присъствие на полоксамер 188.

При предварителните опити беше тествана процедура по получаване без използване на ацетон, при която хлорамбуцилът се разтваря директно в мономера и получената смес се полимеризира във водна среда, подкислена с лимонена киселина, в присъствие на полоксамер 188. Тази процедура води до получаване на стабилни монодисперсни CHL-РВСА наночастици с размер около 170 nm, при което обаче голяма част от мономера с разтвореният в него CHL остават невключени в частиците, образувайки микронно-размерни агрегати. Използването на ацетон за разтваряне на мономера и хлорамбуцила обаче води до много по-ефективно емулгиране и образуване на стабилни CHL-РВСА наночастици с размери около 220-250 nm (Фиг. 25а). Размерът на получените частици не зависи в голяма степен от количеството на използвания мономер ВСА. Частиците CHL-РВСА, получени чрез дисперсионна полимеризация, обаче са по-големи, с широко разпределение по размери (Фиг. 25б) и съответните дисперсии са нестабилни и склонни към агрегация.



Фиг. 25. SEM изображения (*вляво*) и разпределения по размери (*вдясно*) на CHL-PVCA частици, получени чрез полимеризация в присъствие на: а) полосаксер 188 (Pluronic F68), и б) декстран 40 (Yordanov et al. 2010a).



Фиг. 26. ЯМР спектри на: а) PVCA, и б) CHL-PVCA. Сигналите от ароматни протони от молекулите на CHL са ясно забележими в спектъра на CHL-PVCA при 6,5-7,5 ppm (Yordanov et al. 2010a).

Съдържанието на хлорамбуцил в CHL-PBCA наночастиците е около 5,6–7,2% и може да бъде определено директно, както от ЯМР спектрите, така и чрез спектрофотометрични измервания след разтваряне на CHL-PBCA в метилехлорид. За определяне на лекарствено-то съдържание от ЯМР спектъра се използват съотношения на интензитета на сигналите от ароматните протони в молекулите на CHL и определени сигнали от PBCA. Ароматните протони от CHL вграден в PBCA дават сигнали в спектъра при 7,11 и 6,75 ppm (Фиг. 26).

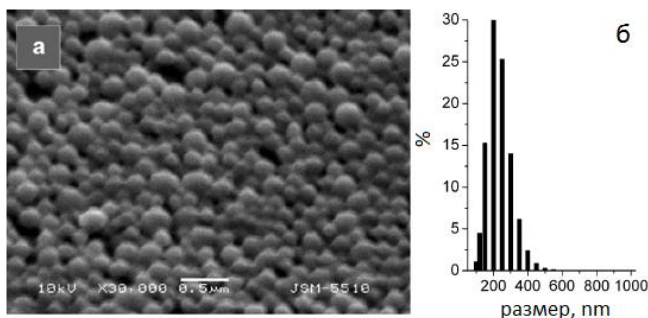
Освобождаването на CHL от CHL-PBCA частиците е изучено във физиологичен фосфатен буфер (pH 7,4) при 37°C чрез диализен метод. Установява се отделяне на CHL в рамките на първите 1-2 часа, което свидетелства за относително слаб афинитет на лекарствените молекули към PBCA носителя. Наблюдаваното относително бързо отделяне ограничаваша потенциала на CHL-PBCA частиците за системно лекарство доставяне, но тези частици биха могли да се тестват в биомедицински експерименти с локално интратуморно приложение.

Известно е, че хлорамбуцилът е нестабилен във водна среда и хидролизира с образуване на моно- и дихидроксилно производни, като хидролизата е потисната в кисела среда (pH<3) (Chatterji et al. 1982). Поради тази причина, с цел осигуряване на кисела среда за по-добра стабилност на CHL, CHL-PBCA дисперсията не се неутрализира след получаването чрез емулсионна полимеризация (която се провежда при pH 2,7 с цел контролиране скоростта на полимеризация). Хидролизата на хлорамбуцила в хода на нашите експерименти при различни условия на съхранение на получените CHL-PBCA дисперсии беше проследена чрез тънкослойна хроматография (TLC). Установено е, че още при получаването на частиците част от CHL хидролизира, при което се получават и двата продукта на хидролиза, но те се откриват във водната дисперсна среда, в която обаче не се открива нехидролизиран CHL. Частиците CHL-PBCA съдържат само нехидролизиран CHL и не съдържат продукти на хидролиза. Съхранението на CHL-PBCA дисперсиите в замразено състояние (-20°C, в присъствие на глюкоза като криопротектор) за поне 3 месеца не води до значително повишаване на хидролизните продукти. Съхранението на CHL-PBCA дисперсиите при стайна температура (20°C) води до бърза и значителна хидролиза на хлорамбуцила, който е практически напълно хидролизиран за период от три месеца.

Получаване на CHL-PBCA наночастици чрез нанопреципитация

Процедурата за получаване на CHL-PBCA формулировките чрез нанопреципитация е подобна на емулсионната полимеризация с разликата, че се използва предварително синтезиран PBCA вместо BSA, при което химическа реакция по време на процеса не протича. При класически използваната емулсионна полимеризация за получаването на PBCA частици полимеризационната среда е подкислена, при което някои лекарства може да са нестабилни, а също така характеристиките на получения полимер силно зависят от различни фактори, което често е пречка за добра възпроизводимост. Освен това, някои лекарствени вещества, особено съдържащи amino-групи, биха могли да се свържат със силно реактивните цианоакрилатни мономери, иницирайки цвитерйонна полимеризация. Тези недостатъци могат да бъдат разрешени при използване на нанопреципитацията.

За целта беше предварително синтезиран разтворим в ацетон PBCA с молекулна маса M_w 2200 (PDI 1,3). Липофилното лекарство, в случая CHL, се разтваря заедно с PBCA в ацетон и този разтвор се прибавя на капки към воден разтвор на съответния колоиден стабилизатор в присъствие на глюкоза и лимонена киселина (с цел осигуряване на кисела среда, в която хидролизата на CHL протича по-бавно). Използването на полисорбат 80 води до получаването на CHL-PBCA частици с размери около 210 nm (Фиг. 27). Частиците, получени с декстран 40 и полуксамер 188 са съответно с размери 240 и 270 nm (Таблица 4).



Фиг. 27. CHL-PBCA наночастици, получени чрез нанопреципитация в присъствие на полисорбат 80: а) SEM изображение; б) разпределение по размери (DLS) (Yordanov and Dushkin 2010).

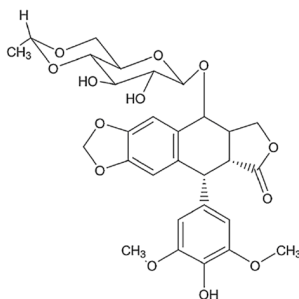
Таблица 4. Характеристики на ПВСА и CHL-ПВСА частици, получени чрез нанопреципитация в присъствие на различни стабилизатори (Yordanov and Dushkin 2010).

частици	стабилизатор	размер nm	PDI
ПВСА	Polysorbate 80	210±5	0.068±0.017
	Dextran 40	238±3	0.059±0.03
	Pluronic F68	269±4	0.158±0.014
CHL-ПВСА	Polysorbate 80	242±6	0.117±0.022
	Dextran 40	245±5	0.094±0.016
	Pluronic F68	295±5	0.158±0.023

Изследванията на скоростта на лекарствено освобождаване чрез диализен метод показват, че CHL се освобождава относително бързо и напуска диализната мембрана за няколко часа, подобно на освобождаването при CHL-ПВСА частиците, които са получени чрез полимеризационен метод. Предварителни проучвания на стабилността на формулировките показват, че дисперсиите могат да бъдат съхранявани при 4°C за няколко дни и при -20°C за няколко месеца без значителна хидролиза на CHL или нарушаване на колоидната стабилност (с изключение на частиците с декстран 40, които са по-нестабилни и агрегират при замразяване на дисперсията).

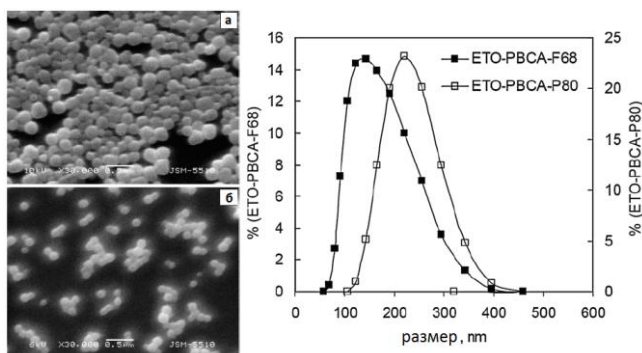
ПВСА наночастици натоварени с етопозид

Етопозидът (ЕТО) е противораково средство от групата на подофилоксините (Фиг. 29), който действа като инхибитор на топоизомераза II и проявява значителна ефективност при дребноклетъчен белодробен карцином и други неопластични заболявания.



Фиг. 28. Структура на етопозид (ЕТО).

При получаването на ЕТО-РВСА частици беше използвана емулсионна полимеризация, при която етопозидът се разтваря заедно с мономера в ацетон и полученият разтвор се прибавя към водна среда в присъствие на глюкоза и стабилизатор: поллоксамер 188 (Pluronic F68) или полисорбат 80. Използването на ацетон се налага от ограничената разтворимост на ЕТО във водната среда. При този процес включването на етопозид в частиците е резултат на неговата липофилна природа. Наблюдението на получените частици със SEM и анализът им с DLS показват размери от 225 и 165 nm, съответно за ЕТО-РВСА-Р80 и ЕТО-РВСА-F68 (Фиг. 29).



Фиг. 29. SEM изображения (вляво) и разпределения по размери от DLS (вдясно) при: а) ЕТО-РВСА-Р80; б) ЕТО-РВСА-F68 (Yordanov et al. 2013b).

Частиците РВСА, които са получени при същите условия, но без ЕТО, са със значително по-малки размери, 118 и 145 nm съответно за РВСА-F68 и РВСА-Р80. Степента на лекарствено натоварване е $68 \pm 3\%$ при ЕТО-РВСА-F68 и $63 \pm 4\%$ за ЕТО-РВСА-Р80. Лекарственото съдържание в наночастиците е $7,4 \pm 0,6\%$ и $6,4 \pm 0,8\%$ съответно за ЕТО-РВСА-F68 и ЕТО-РВСА-Р80 формулировките. Включеният в частиците етопозид не е здраво асоцииран с носителя и повече от 80% от него се отделя при диализа в PBS буфер за около 6-7 ч.

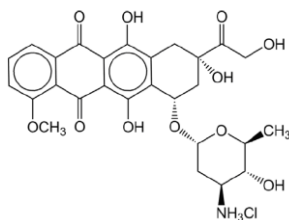
Дзета-потенциалите (измерени при йонна сила 16,5 mM и рН 7,4) на ЕТО-РВСА-Р80 и ЕТО-РВСА-F68 са съответно -12 mV и $-3,8$ mV. Подобни са и дзета-потенциалите на съответните РВСА частици (без ЕТО). По-ниската абсолютна стойност на дзета-потенциала при използване на поллоксамер 188 вероятно е резултат от по-голямата молекулна маса на този сурфактант, който формира по-дебел слой около частиците, като по този начин отдалечава повърхнината на прехлъзване от повърхността на частиците. Получените дисперсии

могат да престоят непроменени в замразено състояние за поне 3 месеца при -20°C , запазвайки колоидната си стабилност при замразяване/размразяване.

Тестове на цитотоксичността върху А549 клетки показват, че най-голям инхибиторен ефект има формулировката ЕТО-РВСА-Р80, при която намалението в жизнеспособността на клетките е 49% в сравнение с 30% цитотоксичност при комерсиалната формулировка на етопозид (“Еbewe”) при еднакви други условия. При третираните клетки са наблюдавани морфологични характеристики на апоптоза с характерна кондензация на хроматина и ядрена фрагментация.

РВСА наночастици натоварени с епирубицин

Антрациклините (епирубицин, доксорубин, даунорубин, пирарубин, и др.) са цитостатици с широкоспектърна антитуморна активност и често биват окачествявани като едни от най-ефикасните противоракови средства (Menna et al. 2012). Противотуморното действие на тези вещества е вероятно резултат от множество механизми на действие, включващи инхибиране синтеза на ДНК чрез интеркалация и взаимодействие с топоизомераза II, както и чрез генериране на реактивни кислородни частици (ROS). Дозо-ограничаващата токсичност на антрациклините се свързва предимно с техния миелосупресивен ефект и кардиотоксичност. Епирубицинът (EPI, Фиг. 30) се счита за по-нетоксичен аналог на по-популярния и често използван в наномедицината доксорубин (Coukell and Faulds 1997), поради което е използван при нашите експерименти.



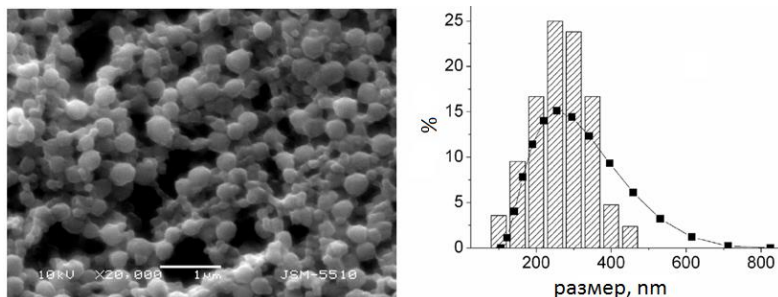
Фиг. 30. Структура на епирубицин (EPI) хидрохлорид.

Тук са представени резултатите от нашите експерименти по натоварване на епирубицин в РВСА частици чрез различни методи: емулсионна полимеризация в система вода/ацетон, нанопреципитация и преполимеризация.

Включване на епирубицин в наночастици от PBCA чрез полимеризация в система вода/ацетон

При този метод частиците EPI-PBCA са получени чрез разтваряне на мономера в ацетон и прибавяне на този разтвор към воден разтвор на епирубицин хидрохлорид в присъствие на глюкоза, колоидни стабилизатори (декстран 40 или полуксамер 188) и лимонена киселина. Проведените експерименти показват, че видът на колоидния стабилизатор оказва съществено значение за размера и стабилността на получените частици PBCA и EPI-PBCA. Стабилни дисперсии на EPI-PBCA частици са получени при използване на стабилизаторите декстран 40 (D40) и полуксамер 188 (P188). Използването на полисорбат 80 в тези случаи води до получаване на нестабилни дисперсии.

Морфологичното охарактеризиране на получените частици чрез електронен микроскоп (SEM) показва, че ненатоварените с лекарство частици са по-малки от натоварените с епирубицин (Таблица 5). По-малки частици се получават в присъствие на полуксамер 188, в сравнение с частиците, получени в присъствие на декстран 40. Частиците EPI-PBCA, получени в присъствие на декстран 40, са със среден размер ~260 nm (Фиг. 31) и не образуват агрегати при съхранение (4°C), поради което тази система е избрана за изучаване ефекта на концентрацията на епирубицин в полимеризационната среда върху размера и лекарственото натоварване (Фиг. 32).



Фиг. 31. SEM изображение (вляво) и разпределение по размери (вдясно) на EPI-PBCA частици, получени в система вода/ацетон в присъствие на декстран 40 (Bedzhova and Yordanov 2013).

Таблица 5. Характеристики на ПВСА и ЕРІ-ПВСА частици, получени от DLS анализ. Дзета-потенциалите са измерени в 0,01 М PBS с рН 7,4 и йонна сила 165 mM (Bedzhova and Yordanov 2013).

частици	стабилизатор	размер, nm	PDI	дзета-потенциал, mV
PVCA	P188	177 ± 10	0.027 ± 0.02	-2.6 ± 1.4
PVCA	D40	480 ± 30	0.211 ± 0.08	-6.7 ± 1.0
ЕРІ-ПВСА ^а	P188	207 ± 11	0.050 ± 0.03	0.25 ± 0.1
ЕРІ-ПВСА ^а	D40	258 ± 12	0.170 ± 0.02	0.51 ± 0.4

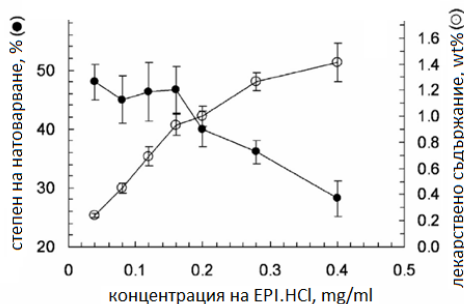
^а ЕРІ.НСІ = 0.2 mg/ml

Видът на използвания колоиден стабилизатор оказва съществен ефект върху степента на лекарствено натоварване при изследваните условия. Например, при начална концентрация на ЕРІ.НСІ във водната среда от 0,2 mg/ml, степента на натоварване на ЕРІ в ПВСА частиците в присъствие на D40 е 40%, докато в присъствие на полоксамер 188 е само 15%. Съхранението на така получените ЕРІ-ПВСА дисперсии при 4°C за няколко часа увеличава степента на натоварване и в двата случая до 50% чрез допълнителна сорбция на ЕРІ. Частиците, стабилизирани с декстран 40, се оказват колоидно стабилни при съхранение за поне два месеца при 4°C, при което не се наблюдават промени в степента на лекарствено натоварване. При същите условия на съхранение частиците, стабилизирани с полоксамер 188, се оказват нестабилни и агрегират в рамките на няколко часа, паралелно със сорбцията на епирубидин и повишаване степента на натоварване до 50% при 4°C.

Средният размер на ЕРІ-ПВСА частиците, получени в присъствието на декстран 40, не зависи значително от концентрацията на ЕРІ.НСІ (от 0,02 до 0,4 mg/ml) в полимеризационната среда и е в интервала 230–270 nm. Тези размери са значително по-малки и подходящи за парентерално приложение в сравнение с предишни формулировки на ЕРІ-ПВСА частици с размери 465 nm, получени при подобни условия, но без използване на ацетон (Vlagoeva et al. 1992). Използването на ацетон вероятно улеснява диспергирането на мономера и формирането на по-малки частици. С повишаване концентрацията на използвания ЕРІ.НСІ се увеличава лекарственото съдържание в получените ЕРІ-ПВСА частици, но при концентрации на ЕРІ.НСІ над 0,2 mg/ml степента на лекарствено натоварване започва да намалява (Фиг. 32).

Дзета-потенциалите на ПВСА частиците са отрицателни, докато тези на ЕРІ-ПВСА са положителни (Таблица 5), което вероятно се дължи на адсорбция на положителните катиони, под формата на

които се намира част от епирубицина в средата. Стойностите на дзета-потенциала са много ниски и колоидната стабилност на дисперсиите се обяснява със стерична стабилизация от D40 и P188.



Фиг. 32. Ефект на концентрацията на EPI.HCl върху степента на лекарствено натоварване и лекарственото съдържание в EPI-PBCA наночастици, получени чрез дисперсионна полимеризация в система вода/ацетон в присъствие на декстран 40 (Bedzhova and Yordanov 2013).

Проведените диализни експерименти с получената формулировка EPI-PBCA с декстран 40 показват, че несвързаното с частиците лекарство дифундира бързо (до няколко часа) през диализната мембрана, докато свързаното с частиците лекарство не се отделя в значителни количества в следващите 6 часа от експеримента. Подобна силна асоциация на натоварени в PBCA частици антрациклини е била наблюдавана и при предишни експерименти (Yang et al. 2000). Молекулите на антрациклините съдържат множество функционални групи, които могат да участват в образуване на H-връзки и ван дер Ваалсови взаимодействия с PBCA (Poupaerta and Couvreur 2003). Силната асоциация на натоварените лекарствени молекули с носителя, както е в този случай, е необходимо за ефективното доставяне на лекарството до целевите клетки, но лекарството трябва да може да бъде освободено от носителя след достигне на целевите клетки.

Анализът с GPC показва относително широко разпределение по молекулни маси, както при PBCA, така и при EPI-PBCA частиците. Молекулно-масовите разпределения и в двата случая могат да се разделят условно на две фракции. При EPI-PBCA частиците нискомолекулната фракция съдържа предимно олигомери с M_w 1060 (PDI 1,4), а високомолекулната фракция е с M_w 28700 (PDI 1,2). Молекулните маси и на двете фракции са по-големи при EPI-PBCA в сравнение с PBCA частиците.

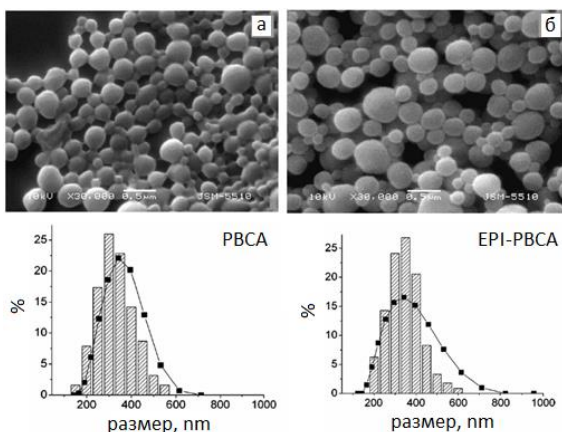
Включване на епирубицин в РВСА частици чрез нанопреципитация

При нашите опити ЕРІ беше включен успешно в частици от РВСА чрез нанопреципитация. За тази цел, предварително синтезиран РВСА е разтворен в ацетон и прибавен към воден разтвор на епирубицин хидрохлорид (ЕРІ.НСІ) в присъствие на фосфатен буфер и колоиден стабилизатор (декстран 40 или полоксамер 188), след което ацетонът е изпарен под вакуум. Получените частици са суб-микронни, с размер около 350–360 nm (Фиг. 33). Не е установен значителен ефект на концентрацията на ЕРІ.НСІ върху средния размер на частиците и полидисперсия индекс (Таблица 6).

Таблица 6. Характеристики на частици РВСА и ЕРІ-РВСА, получени чрез нанопреципитация в присъствие на декстран 40 при различни концентрации на ЕРІ.НСІ (Yordanov et al. 2012).

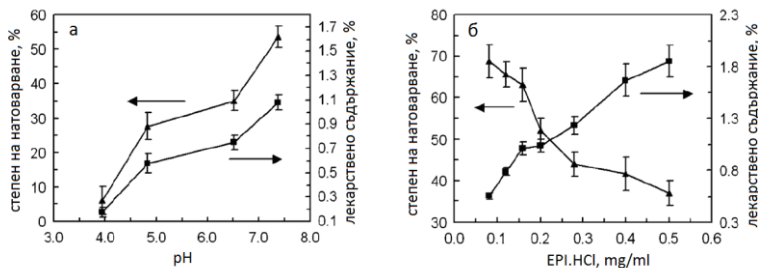
ЕРІ.НСІ, mg/ml	размер, nm	PDI
–	345 ± 17	0.20 ± 0.05
0.12	359 ± 19	0.21 ± 0.08
0.20	365 ± 18	0.19 ± 0.06
0.40	354 ± 22	0.18 ± 0.08
1.00**	355 ± 24	0.21 ± 0.09

** приготвени в среда без PBS



Фиг. 33. SEM изображения и разпределения по размери на: а) РВСА, и б) ЕРІ-РВСА частици, получени чрез нанопреципитация в присъствие на декстран 40. Частиците ЕРІ-РВСА са получени при 1 mg/ml ЕРІ.НСІ (Yordanov et al. 2012).

Увеличаването на концентрацията на ЕРІ (при постоянно рН 7,4) води до получаване на частици с по-голямо лекарствено съдържание, но степента на натоварване намалява (Фиг. 34), при което концентрацията на ЕРІ във водната среда се оказва съществен параметър за контрол на лекарственото съдържание в частиците. Използването на по-високи концентрации на ЕРІ.НСІ е ограничено от разтворимостта му във фосфатния PBS буфер при рН 7,4 (0,7 mg/ml при 20°C).



Фиг. 34. Зависимост на степента на натоварване и лекарственото съдържание за ЕРІ-РВСА, получени чрез нанопреципитация при различни: а) рН, и б) концентрации на ЕРІ.НСІ (Yordanov et al. 2012).

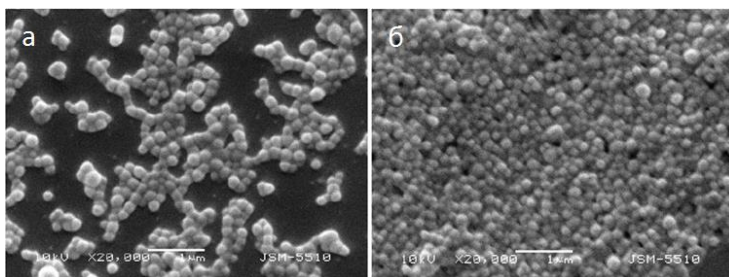
Частици с по-голямо лекарствено съдържание и висока степен на лекарствено натоварване се получават при по-високи стойности на рН (в интервал от рН 4 до 7,4). Лекарственото съдържание се увеличава пропорционално с повишаване степента на натоварване поради постоянното съдържание на ЕРІ във формулировките. Експерименти при рН>7,4 не са провеждани поради нестабилността на лекарственото вещество в алкална среда, при което настъпва хидролиза.

Дзета-потенциалите на натоварените РВСА частици, получени по същия начин при еднакви други условия в PBS буфер (рН 7,4) е $-5,3 \pm 0,7$ mV. Дзета-потенциалът на ЕРІ-РВСА частиците (получени при ЕРІ.НСІ 0,2 mg/ml и рН 7,4) е също отрицателен, но с по-малка абсолютна стойност, $-2,1 \pm 1,4$ mV. Това може да се дължи на адсорбцията на катионната форма на ЕРІ върху отрицателно заредената повърхност на РВСА частиците. Адсорбцията на ЕРІ също така може да измества част от адсорбираните молекули на колоидния стабилизатор, тъй като частиците с по-голямо лекарствено съдържание са по-малко стабилни и по-лесно седиментират. При стойности на рН около неутралното по-голяма част от ЕРІ е в неговата основна (незаредена) форма, която има относително по-ниска разтворимост във

вода (93 mg/l). Може да се предположи, че при тези стойности на рН се благоприятства включването на базовата форма на епирубицина в хидрофобната вътрешност на ПВСА частиците. Изследванията на освобождаването на ЕРІ показват, че ЕРІ е здраво асоцииран с частиците, подобно на ЕРІ-ПВСА, получени чрез полимеризационни методи. Само около 10% от натоварения в частиците ЕРІ се освобождава при 37°C във фосфатен буфер за 10 часа.

Включване на епирубицин в ПВСА частици чрез преполимеризация

Епирубицин беше включен успешно в частици от ПВСА чрез преполимеризация. За тази цел, мономерът полимеризира предварително за 30 минути в солно-кисел (рН 2) воден разтвор на полксамер 188, след което към получената дисперсия се прибавя разтвор на ЕРІ.НС1 и полимеризацията продължава още 2,5 часа, дисперсията се неутрализира и се съхранява при рН 7,4 за една седмица при 4°C. Получените частици са монодисперсни, със средни размери около 220-250 nm (Фиг. 35; Таблица 7).



Фиг. 35. SEM изображения на: а) ПВСА, и б) ЕРІ-ПВСА (съдържащи 0,14 mmol ЕРІ/g ПВСА) получени чрез преполимеризация (Yordanov et al. 2013).

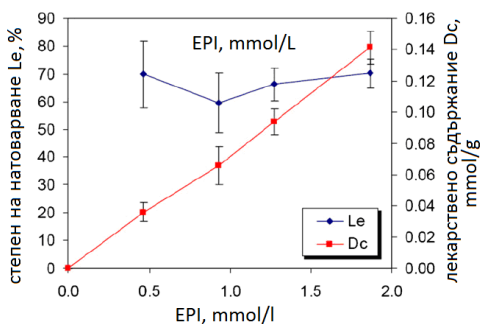
Таблица 7. Характеристики на наночастици ПВСА и ЕРІ-ПВСА, получени при различни концентрации на ЕРІ. Данните са получени от DLS измервания при 25°C в PBS буфер (рН 7,4) (Yordanov et al. 2013).

ЕРІ (mmol/l)	размер (nm)	PDI	дзета-пот. (mV)
-	216 ± 4	0.03 ± 0.01	-3.5 ± 0.4
0.46	237 ± 5	0.04 ± 0.02	-1.9 ± 0.8
0.93	244 ± 5	0.03 ± 0.01	7.5 ± 0.5
1.27	250 ± 8	0.13 ± 0.02	10.9 ± 0.7
1.87	300 ± 9 ^a	0.14 ± 0.02	11.1 ± 0.2

^a по данни от SEM ~250 nm.

Измерванията с DLS показват по-големи размери и относително по-широко разпределение при EPI-PBCA частиците получени при концентрации на EPI.HCl > 1,5 mmol/l, вероятно в резултат на частична агрегация, тъй като наблюденията със SEM в тези случаи показват размери на индивидуалните частици около 250 nm. Дисперсиите, получени при по-високи концентрации на EPI са и по-нестабилни, със склонност към седиментация. Преполимеризацията осигурява получаването на относително по-малки частици EPI-PBCA в сравнение с нанопреципитацията, при която се получават частици с размери около 350 nm, както и директната полимеризация на мономера във воден разтвор на EPI, при която се получават частици с размери от 465 nm (Blagoeva et al. 1992).

Тъй като равновесието между протонираната и базовата (неутрална) форма на EPI е рН-зависимо, рН на получените дисперсии в тези опити е фиксирано на 7,4 след приключване на полимеризацията и се дава възможност за установяване на равновесие между натовареното и ненатовареното в частиците лекарство за около една седмица чрез съхранение при 4°C. Проведени са серия експерименти при различна концентрация на EPI.HCl в полимеризационната среда с цел установяване на ефекта върху степента на натоварване и лекарственото съдържание (Фиг. 36).



Фиг. 36. Зависимост на степента на натоварване и лекарственото съдържание от концентрацията на EPI в полимеризационната среда при EPI-PBCA наночастици, получени чрез преполимеризация при концентрация на мономер (BCA) от 10 mg/ml (Yordanov et al. 2013).

При проведените експерименти степента на натоварване се оказва постоянна, около 60–70% и не зависи значително от концентрацията на EPI. Подобни степени на натоварване са получени при предишни опити върху включването на доксорубин в наночастици

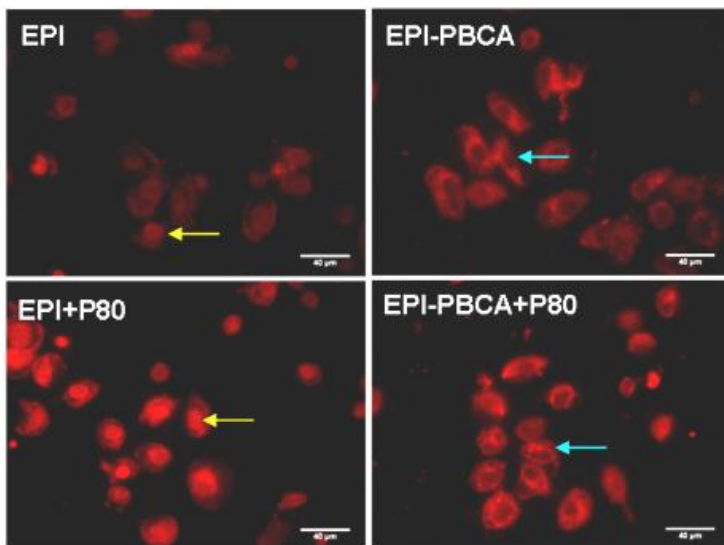
от поли(изохексилциноакрилат) (PНСА) чрез използване на подобен метод за получаване (Wohlfart et al. 2011). Лекарственото съдържание се повишава почти линейно с повишаване концентрацията на ЕРІ. Натовареният в РВСА частиците ЕРІ е относително здраво асоцииран с тях и се освобождава бавно (по-малко от 10% от натовареното лекарство се освобождава за 10 часа при рН 7,4), подобно на ЕРІ-РВСА, получени чрез нанопреципитация.

Измерванията на дзета-потенциалите при рН 7,4 и йонна сила 16,5 mM показват стойности $-3,5$ и -14 mV за ненатоварените РВСА частици, стабилизирани съответно с полоксамер 188 и полисорбат 80. Дзета-потенциалите са положителни при ЕРІ-РВСА частиците с лекарствено съдържание над 0,06 mmol/g. Промяната в знака на дзета-потенциала е вероятно резултат от адсорбцията на ЕРІ в неговата катионна форма на повърхността на частиците. При адсорбцията вероятно се измества част от молекулите на колоидния стабилизатор, тъй като дисперсиите на частиците с по-високо лекарствено съдържание имат по-голяма склонност към седиментация. Дисперсиите, съдържащи полисорбат 80, са относително по-нестабилни от тези с полоксамер 188.

Ефекти на РВСА и ЕРІ-РВСА наночастици върху клетки от белодробен аденокарцином (A549) и цервикален карцином (HeLa)

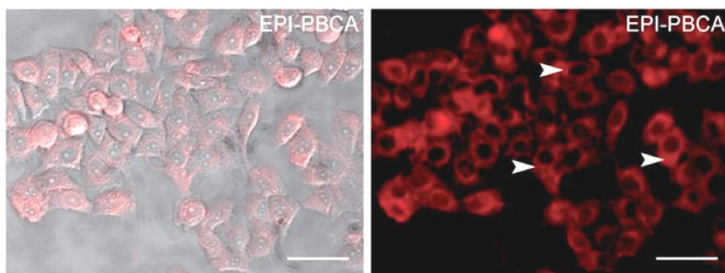
Възможността за повишаване цитотоксичността и акумулирането на епирубин в клетки от белодробни аденокарциноми чрез използване на наночастици е от интерес, тъй като този тип неоплазии са слабо чувствителни към епирубин. За тази цел, при нашите опити използвахме ЕРІ-РВСА, получени чрез преполимеризация и пост-синтетично модифицирани с два различни съфактанта: полоксамер 188 (F68) и полисорбат 80 (P80). Всички формулировки са инкубирани за 24 часа с А549 клетки при концентрация на ЕРІ в тях от 3 $\mu\text{g/ml}$. Формулировките с ЕРІ-РВСА съдържат само натоварен в частиците ЕРІ (ненатовареният е отстранен чрез центрофугиране, след което частиците са редиспергирани в буфер). Жизнеспособността на клетките (определена чрез МТТ метод) при чистия ЕРІ.НСІ при тези условия е 85% спрямо нетретираната контрола, докато формулировките ЕРІ-РВСА+P80 и ЕРІ-РВСА-F68 водят до клетъчна жизнеспособност, съответно 30 и 40%. Установено е, че при използваните концентрации стабилизаторите F68 и P80 са нетоксични, но повишават значимо цитотоксичността на всички формулировки на ЕРІ и водят до повишено лекарствено проникване в клетките. Повишаване

на цитотоксичността на антрациклините (като доксорубин) след вграждането им в наночастици от ПВСА и комбинирането им със сърфактанти е наблюдавано и от други автори (De Juan et al. 2006; Wohlfart et al. 2011), въпреки че механизмите на тези ефекти остават неизяснени. Известно е, че сърфактанти от този тип повишават проникването на някои вещества през клетъчната мембрана (Hodes et al. 1960) и могат да инхибират функцията на Р-гликопротеина (Li-Blatter et al. 2009), което може да доведе до повишена акумулация на лекарствените молекули в клетките. Флуоресцентните свойства на ЕРІ позволяват проследяване на вътреклетъчната му локализация с помощта на флуоресцентен микроскоп. Проведените експерименти показват предимно ядрена локализация на ЕРІ, когато не е свързан с наночастици, и цитоплазмена локализация на ЕРІ-ПВСА (Фиг. 37). Цитоплазмената локализация на ЕРІ-ПВСА изглежда хетерогенна: налице са флуоресциращи грануларни структури съдържащи повисоки концентрации от ЕРІ-ПВСА, предимно с разположение около клетъчното ядро, за които се предполага, че са енодозомни везикули, в които наночастиците са попаднали чрез ендцитоза.



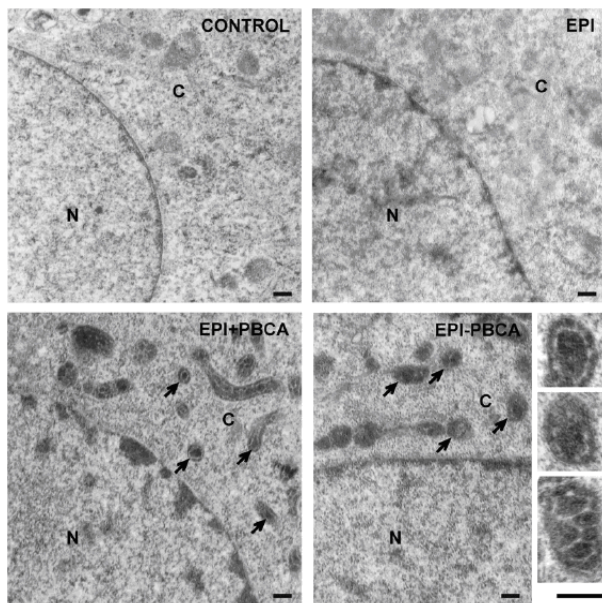
Фиг. 37. Флуоресцентни изображения на проникването на ЕРІ в А549 клетки, приложен като различни формулировки с концентрация 3 µg/ml и инкубация за 2 часа. Стрелките показват ядрена (*жълти*) и цитоплазмена (*сини*) локализация на лекарството; бар: 40 µm (Yordanov et al. 2013).

Изследванията на цитотоксичността на същите EPI-PBCA частици при клетки от цервикален карцином (HeLa) показват, че EPI-PBCA формулировката проявява два пъти по-слаба цитотоксичност от ненаатоварения в частици EPI (съответно 20% и 40% клетъчна жизнеспособност). Вероятно това се дължи на силната асоциация на EPI с носителя, а и вероятна разлика в чувствителността на различните клетъчни линии към различните формулировки на EPI (тъй като при A549 клетките EPI-PBCA са по-цитотоксични от EPI). Както при A549 клетките, така и при HeLa клетките, EPI-PBCA частиците се локализиращат в цитоплазмата (Фиг. 38), най-вероятно в резултат на ендоцитоза, при което EPI остава свързан с частиците в рамките на проведения експеримент (2 часа).



Фиг. 38. Цитоплазмена локализация на EPI-PBCA частици в HeLa клетки: микроскопски изображения с фазов контраст и флуоресценция (ляво) и само флуоресценция (дясно) (бар: 50 μm) (Evangelatov et al. 2016).

За потвърждаване на ендоцитозата като механизъм на проникване на PBCA и EPI-PBCA частиците в раковите клетки бяха проведени наблюдения с трансмисионен електронен микроскоп (ТЕМ) на HeLa клетки, третиращи с различни формулировки. В клетките, които са третиращи с формулировки, съдържащи PBCA частици, се наблюдават везикуларни структури, представляващи ендоцитирани наночастици обградени с ендозомни мембрани (Фиг. 39). Такива структури в цитоплазмата на нетретиращите клетки, както и при клетките третиращи с ненаатоварен в частици EPI, не се наблюдават. Също така, наблюдение на HeLa клетки, третиращи с PBCA наночастици, с флуоресцентен микроскоп след оцветяване на ендозомите с акридин оранж показва значително повишаване броя на ендозомите в третиращите с наночастици клетки, вероятно в резултат на образуване на ендозоми с ендоцитирани в тях наночастици. Проведени бяха и Western blot анализи за установяване активността на каспаза-3 и p53.



Фиг. 39. ТЕМ изображения на нетретиранни HeLa клетки (control) и третиранни с EPI, EPI+PBCA или EPI-PBCA за 6 часа при 2 $\mu\text{g/ml}$ EPI и масово отношение EPI/PBCA 0,7/5. Стрелките показват ендозомната локализация на наночастиците. Дадени са снимки на единични ендозоми (N: ядро; C: цитоплазма; бар: 200 nm) (Evangelatov et al. 2016).

Проведените изследвания показват, че формулировката EPI-PBCA води до приблизително двойно повишаване активността на каспаза-3 (маркер за апоптоза) в сравнение с ненатоварения в наночастици EPI. В същото време експресията на p53 е силно индуцирана от ненатоварения EPI, но не и от EPI-PBCA. Тези данни подсказват, че конвенционалното използване на EPI води до проникване на лекарството през клетъчните мембрани и локализацията му в ядрото, където блокира синтеза на ДНК и РНК, при което вероятно активира клетъчните механизми за репарация. Известно е, че протеинът p53 регулира експресията на множество гени, свързани с поправката на ДНК, спиране на клетъчния цикъл и индукция на апоптоза при непоправими повреди в ДНК (Fridman and Lowe 2003). Наночастиците EPI-PBCA действат по различен механизъм, индуцирайки силен апоптичен сигнал (високи нива на активирана каспаза-3) без активиране на репаративните механизми (без значимо покачване на p53). Най-вероятно този ефект се дължи на невъзможността на здраво асо-

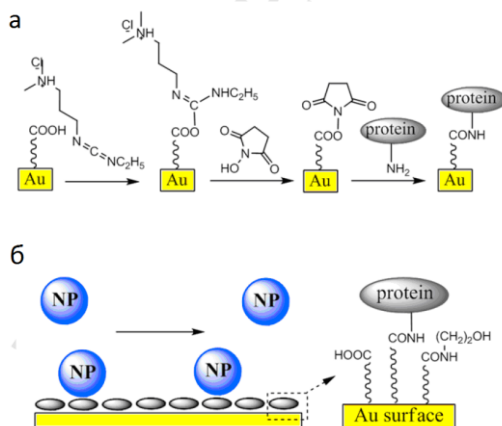
цирания с частиците EPI да проникне в ядрото на клетката (за разлика от ненатоварения в частици EPI), но попадайки в ендозомите, не се екскретира от клетките и действа про-апоптично (видно от активирането на каспаза-3) по друг механизъм, който може би е свързан с възможността на EPI да участва в продукцията на активни кислородни частици (ROS) в ендозомите.

Взаимодействия между протеини и PBCA-базирани наночастици

Техниката с използване на повърхностен плазмон резонанс (SPR) може да се използва за изучаване на афинитетни и кинетични параметри на взаимодействията между различни макромолекули и наноструктури (Canovi et al. 2012). Основава се на измерване на индекса на рефракция в непосредствена близост до тънък метален (най-често златен) филм в отговор на взаимодействия с макромолекули или наночастици. За тази цел, едно от двете взаимодействащи си вещества се имобилизира върху повърхността на златния филм (нанесен върху стъклена подложка и наречен сензорен чип), а другото вещество се пропуска през микрофлуидна система и се привежда в контакт с имобилизираното върху чипа вещество. Взаимодействието между двете вещества се наблюдава като промяна в рефракционния индекс в резултат на адсорбцията/десорбцията на вещество на повърхността на чипа.

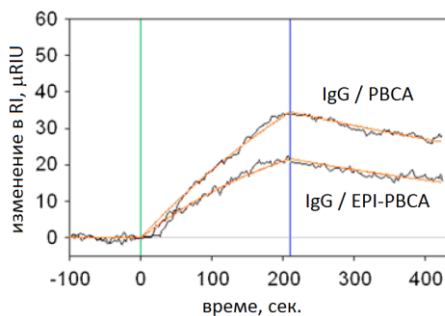
При нашите експерименти бяха използвани PBCA и EPI-PBCA наночастици с размер 200–220 nm, получени чрез преполимеризация. Наночастиците EPI-PBCA са получени с лекарствено съдържание 0,06 mmol/g. Дзета-потенциалите на така получените (стабилизирани с полоксамер 188) частици PBCA и EPI-PBCA и диспергирани в PBS буфер при 37°C са съответно -1,1 и -0,8 mV. След прехвърлянето им в PBST (PBS+полисорбат 80) при 37°C, дзета-потенциалите на PBCA и EPI-PBCA частиците са също отрицателни, съответно -2,5 и -5,6 mV. Протеин-модифицираните сензорни чипове са получени чрез имобилизация на съответния протеин чрез карбодиимидна реакция върху чип, който е покрит с карбоксиметилиран декстран (Фиг. 40). Взаимодействието на наночастиците е изследвано с три различни протеина от човешка кръвна плазма: албумин (HSA), имуноглобулин G (IgG) и фибриноген (Fib). Използваната концентрация на частици е ниска и адсорбцията им върху чипа води до слабо изменение в рефракционния индекс ($\mu\text{RIU} < 50$), но десорбцията им е бавна и при по-високи частичкови концентрации регенерацията на чипа (с глици-

нов буфер с pH 10 и 2M NaCl) е трудна. Всички експерименти са проведени при постоянна концентрация на частиците, скорост на потока и температура 37°C.



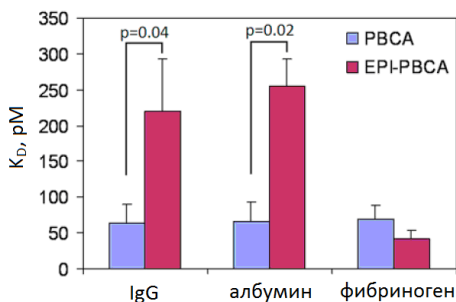
Фиг. 40. Схематична илюстрация на: а) имобилизацията на протеини; б) SPR експериментите с наночастици, взаимодействащи с имобилизирани протеини (Yordanov et al. 2016b).

Сензограмите, получени в резултат на взаимодействието на наночастиците с протеин-модифицираните чипове, имат вида показан на Фиг. 41. Данните са анализирани чрез кинетичен модел на взаимодействие частица:протеин 1:1 (чрез софтуер Scrubber), при което са определени скоростните константи на асоциация (K_a), дисоциация (K_d) и теоретичния максимален отговор (R_{max}).



Фиг. 41. Примерни сензограми на взаимодействието на PBCA и EPI-PBCA наночастици с имуноглобулин IgG (Yordanov et al. 2016b).

Равновестната константа на дисоциация е определена имайки предвид частичковата концентрация и съответните скоростни константи, $K_D=K_d/K_a$. Числените стойности на тези константи следва да се приемат като относителни и могат да се използват единствено за сравнение в рамките на конкретната експериментална постановка. Стойностите на K_a показват, че РВСА частиците взаимодействат по-бързо с албумин и IgG в сравнение с ЕРІ-РВСА частиците. Големи стойности на K_D съответстват на по-слабо взаимодействие между частиците и протеините, и обратно. Например, РВСА частиците взаимодействат по-силно с албумин и IgG в сравнение с ЕРІ-РВСА. Взаимодействието на ЕРІ-РВСА частиците с фибриноген е много по-силно, отколкото взаимодействието им с албумин и IgG (Фиг. 42).



Фиг. 42. Дисоциационна константа на взаимодействията между РВСА и ЕРІ-РВСА наночастици с различни протеини (албумин, имуноглобулин IgG и фибриноген) имобилизирани върху сензорен чип (Yordanov et al. 2016b).

Скоростта на асоциация между наночастиците и протеините в разтвор зависи, както от скоростната константа на асоциация, така и от концентрацията на протеина в разтвора. Предишни изследвания показват, че това определя динамичния характер на състава на протеиновата „корона“ около наночастиците, която в първите моменти от контакта им с кръвна плазма е по-богата на протеини с по-висока концентрация (като албумин), които на по-късен етап се изместват от протеини с по-ниска концентрация в кръвта, но с по-голям афинитет към наночастиците (като например някои аполипопротеини) (Göppert and Müller 2005).

Наночастици от PSMA като лекарствени носители

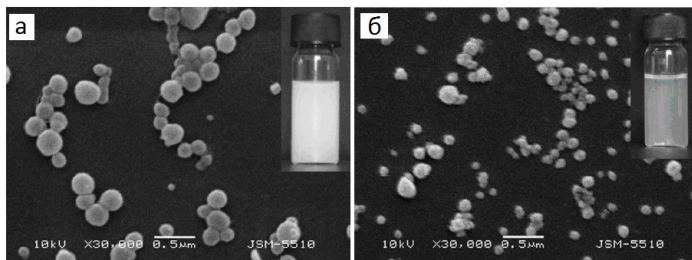
Получаване на PSMA наночастици и натоварване с епирубицин

Наночастици от PSMA бяха успешно получени чрез нанопреципитация и натоварени с епирубицин. За тази цел, беше синтезиран PSMA чрез хидролиза на съответния анхидрид (с молекулна маса $M_n \sim 1900$), след което полученият PSMA под формата на ацетонов разтвор се прибавя бавно при разбъркване към физиологичен фосфатен буфер. Натоварването с епирубицин се осъществява чрез сорбция, след прибавяне на воден разтвор на EPi.HCl . При тези експерименти беше използван PSMA съполимер съдържащ 75 wt% стирен с ограничена разтворимост във вода, което позволява използването на нанопреципитационния метод. Карбоксилните групи от полимера се ориентират предимно към водната фаза и осигуряват стабилизацията на частиците, поради което не се налага използване на допълнителен колоиден стабилизатор. Този подход дава възможност за фин контрол върху размера на частиците чрез: i) концентрацията на полимера в ацетоновия разтвор, и ii) обемното съотношение ацетон/PBS.

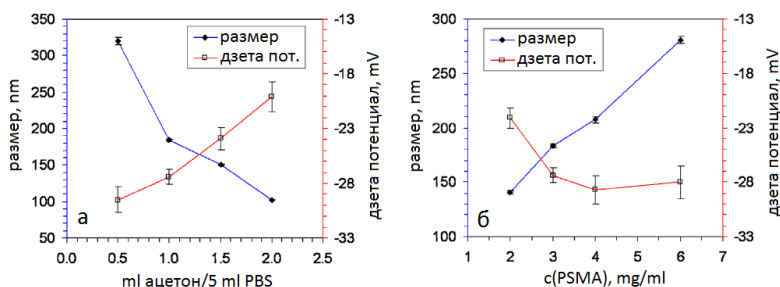
Ефектът на съотношението ацетон/PBS е изучено чрез разтваряне на определено количество PSMA (15 mg) в различни обеми ацетон (от 0,5 до 2,0 ml) и добавянето на този разтвор към постоянен обем PBS (5 ml). Увеличаването на съотношението ацетон/PBS води до намаляване мътността на дисперсията и получаване на по-малки по размери частици. SEM изображения и фотографии на дисперсиите на пробите PSMA-1A (ацетон/PBS 1/5) и PSMA-2A (ацетон/PBS 2/5) са показани на Фиг. 43, а зависимостите на размера и дзета-потенциалите от съотношението ацетон/PBS са показани на Фиг. 44а.

Дзета-потенциалите на получените частици намаляват по абсолютна стойност (от -30 mV до -20 mV) с увеличаване на съотношението ацетон/PBS. Средният размер на частиците, получен чрез DLS, добре съответства на размерите от SEM изображенията. Размерът на получаващите се частици намалява почти линейно (от 320 до 100 nm) с увеличаване на съотношението ацетон/PBS. Дисперсиите, получени при ацетон/PBS $\leq 0,5/5$, показват склонност към седиментация вероятно поради големия размер на частиците (въпреки големите абсолютни стойности на дзета-потенциала). Малките частици PSMA (като PSMA-2A), получени при големи съотношения ацетон/PBS, също проявяват тенденция към образуване на агрегати (които могат да се

разбият при обработка с ултразвук), вероятно поради по-малките стойности на дзета-потенциала и понижената електростатична стабилизация при тези частици.



Фиг. 43. SEM изображения на PSMA наночастици: а) PSMA-1A; б) PSMA-2A (Angelova and Yordanov 2014a).



Фиг. 44. Зависимост на средния размер (z-average) на PSMA наночастици и техните дзета-потенциали от: а) съотношението ацетон/PBS; б) концентрацията на PSMA (Angelova and Yordanov 2014a).

Получаването на по-малки частици при по-големи съотношения ацетон/PBS вероятно се дължи на по-добро диспергиране на PSMA по време на фазовата сепарация в PBS буфера. Също така, големите съотношения ацетон/PBS осигуряват по-малко полярна среда, в която ориентацията на карбоксилните групи от полимера към дисперсната среда е намалена, което би могло да е причина за по-ниските абсолютни стойности на дзета-потенциала на частиците в този случай. Тъй като показаните на Фиг. 44 данни се отнасят за частиците след изпарението на ацетона, следва да се приеме, че веднъж формирани в системата ацетон/PBS, частиците запазват размера и свойствата си относително непроменени при изпарението на ацетона.

Ефектите на концентрацията на полимера са изучени, като се разтваря различно количество PSMA (10–30 mg) в постоянен обем ацетон (1,0 ml) и полученият разтвор се прибавя към постоянен обем PBS (5 ml). Концентрацията на PSMA на Фиг. 44б е дадена спрямо обема на PBS (5 ml; след изпарението на ацетона). Повишаването на концентрацията на PSMA води до получаване на дисперсии с по-голяма оптична плътност, по-големи размери на частиците и по-широки разпределения по размери (Фиг. 44б). Дзета-потенциалът на частиците получени при PSMA > 3,0 mg/ml е относително независим от концентрацията на използвания полимер и е около -28 mV.

Смесването на разтвор на EPI.HCl с получените дисперсии на PSMA наночастиците в PBS води до почти мигновена асоциация между EPI и PSMA. Стабилни EPI-PSMA наночастици са получени при концентрации на EPI.HCl до 0,3–0,4 mg/ml (при PSMA концентрация от 1,5 mg/ml). При концентрации на EPI.HCl от 0,5–0,6 mg/ml се наблюдава засилена седиментация на частиците, а при EPI.HCl \geq 0,8 mg/ml частиците агрегират. Наблюдения чрез SEM показват, че размерът и морфологията на частиците не се променя значително в резултат на натоварването с EPI, въпреки че данните от DLS анализите показват малко увеличаване на средния размер, например от 181 на 207 nm съответно при PSMA-1A и EPI-PSMA-1A.

Интересен резултат е фактът, че натоварването на епирубицина в PSMA наночастиците не води до голяма промяна в дзета-потенциала им, който остава отрицателен. Това е различно от ситуацията при PBCA частиците, при които натоварването с EPI води до намаляване на абсолютната стойност на отрицателния дзета-потенциал и положителен дзета-потенциал при по-високи концентрации на EPI. Може да се предположи, че EPI молекулите проникват във вътрешността на PSMA частиците, където взаимодействат чрез интеркалация с ароматните пръстенни системи от молекулите на полимера, като по този начин не оказват съществен ефект върху повърхностните свойства на частиците. При по-високи концентрации на EPI.HCl количеството на повърхностно адсорбираните EPI катиони се увеличава, което намалява електростатичната стабилизация на частиците и се образуват агрегати. Асоциацията на EPI с PSMA оказва също така влияние върху флуоресцентните му свойства. Флуоресценцията на EPI (с максимум на излъчване при 595 nm) силно намалява интензитета си при натоварването му в PSMA частиците. Подобно намаление на интензитета на флуоресценцията е било наблюдавано преди при PSMA-базирани мицеларни формулировки на доксорубицин (Greish et al. 2004) и пирарубицин (Greish et al. 2005).

Степента на лекарствено натоварване е около 84% и е определена при по-големите частици чрез центрофугиране и спектрофотометрично определяне на концентрацията на EPI в оптично прозрачната супернатанта. При диализа на тази супернатанта през мембрана с пори 12 kDa е установено, че EPI не преминава през диализната мембрана, за разлика от воден разтвор на EPI.HCl, 90% от който преминава през мембраната за същия период (3 ч). Този експеримент показва, че EPI в супернатанта не е в свободна форма и вероятно е асоцииран с PSMA наноструктури. Лекарственото освобождаване от EPI-PSMA формулировките, изследвано чрез диализа спрямо PBS буфер, е бавно, при което около 10-15% от EPI се освобождава за период от 7 ч при 37°C (докато EPI.HCl дифундира почти напълно през мембраната в рамките на 3 ч).

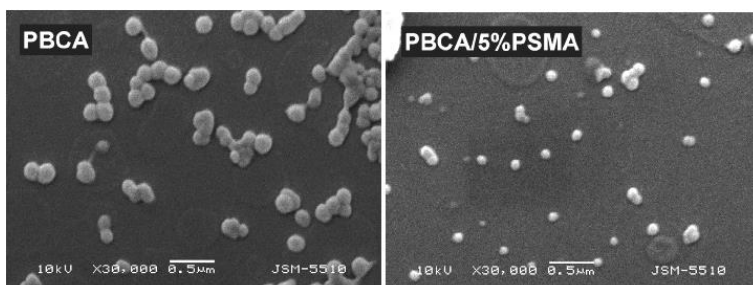
Тъй като основният протеин в кръвната плазма е албуминът и също така е известно, че той взаимодейства силно с PSMA (Kobayashi et al. 1988), бяха проведени експерименти за установяване ефекта на албумина (HSA) върху размера и електрокинетичните свойства на PSMA наночастиците. В присъствие на албумин (10 mg/ml) дзета-потенциалът значително се променя, например от -28 ± 2 mV на -15 ± 2 mV, който ефект може да се дължи на адсорбция на албуминовите молекули върху повърхността на наночастиците. Въпреки намалената абсолютна стойност на дзета-потенциала, дисперсиите остават стабилни във физиологичния буфер вероятно в резултат на стерична стабилизация от албумина. Механизмите на взаимодействие на отрицателно заредени протеинови молекули с полианионни повърхности са описани от други автори (Vos et al. 2010).

Изследвана беше също така стабилността на PSMA и EPI-PSMA наночастиците в зависимост от pH. Установено е, че дисперсиите са стабилни в pH интервала от 4,5 до 9,3. При $\text{pH} > 9,3$ колоидната дисперсия бързо се превръща в прозрачен разтвор поради дезинтеграцията на частиците и разтваряне на полимера в алкалната среда. При $\text{pH} < 4,5$ в дисперсиите се образуват преципитати в резултат на агрегация на частиците (поради намалената електростатична стабилизация в резултат на протониране на карбоксилатните групи). Интересно е, че образуваните агрегати от частици могат да се редиспергират до стабилни частици при обратно повишаване на pH до 7,4 и ултразвукова обработка. Наблюдаваните преходи в състоянието на дисперсиите при pH 4,5 до 9,3 не се повлияват съществено от натоварването на PSMA наночастиците с епирубидин.

Наночастици от PBCA/PSMA като носители на епирубицин

Идеята за получаване на албумин-стабилизирани наночастици от PBCA/PSMA се основава на предположението, че PSMA в качеството си на амфифилен съполимер следва да се отложи на повърхността при получаването на частици от PBCA/PSMA чрез нанопреципитация, при което може да служи като „свързващо звено“ за формиране на допълнителна обвивка от албумин, която да стабилизира стерично допълнително частиците във физиологичен буфер. Наночастиците от PBCA/PSMA могат да бъдат натоварени с епирубицин чрез сорбция преди обвиването с албумин. За целта бяха използвани предварително синтезирани PSMA и PBCA.

Наблюденията със SEM показват, че всички PBCA/PSMA частици са с размери <200 nm. Дори 5 wt% PSMA води до получаване на по-малки (145 nm) PBCA/PSMA частици, в сравнение с по-големите (200 nm) PBCA частици (Фиг. 45).

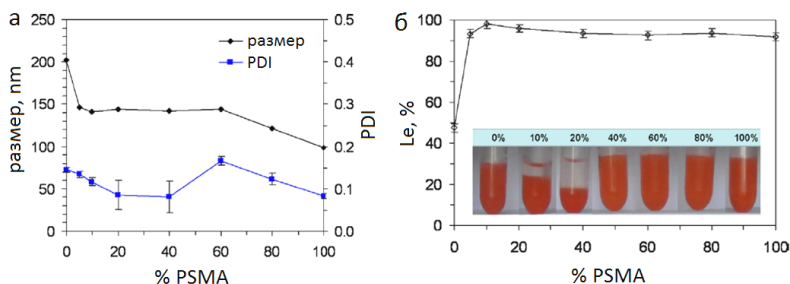


Фиг. 45. SEM изображения на частици PBCA и PBCA/PSMA (съдържащи 5 wt% PSMA) (Angelova and Yordanov 2015).

При получаването на дисперсиите на PBCA и EPI-PBCA частици чрез нанопреципитация е използван поллоксамер 188 като колоиден стабилизатор. За разлика от тях, PBCA/PSMA наночастиците са стабилни и без използване на стабилизатор, с относително тясно разпределение по размери. Натоварването с EPI чрез сорбция не оказва съществено влияние върху размерите на частиците. Повишената стабилност на PBCA/PSMA частиците в сравнение с PBCA се обяснява с отлагане на амфифилния полимер PSMA на повърхността на частиците, което води до повишена електростатична стабилност, видно от по-големите абсолютни стойности на отрицателния дзета-потенциал при PBCA/PSMA частиците. Увеличаването на съдържа-

нието на PSMA от 5 до 60% не оказва значителен ефект върху размера на частиците (Fig. 46a), докато повишаването му над 60% води до намаляване на размера, който достига около 100 nm при PSMA частиците. Индексът на полидисперсност (PDI), определен чрез DLS, не зависи в голяма степен от състава на PBCA/PSMA частиците.

Натоварването с EPI беше осъществено чрез сорбция. Дори само 5 wt% PSMA са достатъчни за достигане степен на натоварване на EPI в PBCA/PSMA частиците от 95% в сравнение с PBCA частиците (~45%) (Фиг. 46б). Дисперсиите на натоварените с EPI частици със съдържание на PSMA < 20% проявяват тенденция към агрегиране (Фиг. 46б). Тези дисперсии могат да бъдат стабилизиращи чрез прибавяне на серумен албумин (HSA). Тъй като асоциацията на EPI с PBCA/PSMA частиците е почти мигновена, може да се предположи, че EPI взаимодейства основно с PSMA компонента. За разлика от PBCA/PSMA, сорбцията на EPI върху PBCA частиците изисква поне едно денонощие за достигане на равновесие.



Фиг. 46. Ефект на wt% на PSMA в PBCA/PSMA частиците върху: а) средния размер и индекс на полидисперсност (PDI); б) степента на натоварване (Le) с EPI (дадени са фотографии на съответните дисперсии при определен wt% PSMA) (Angelova and Yordanov 2015).

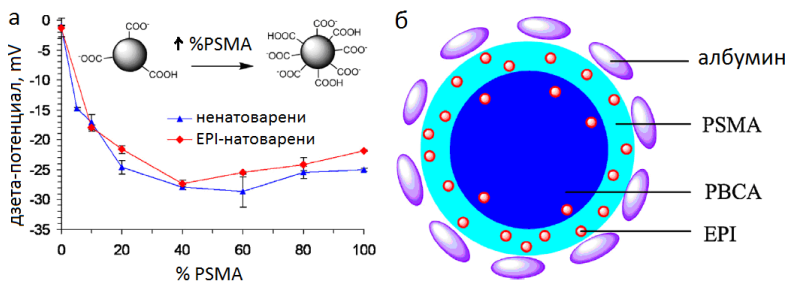
Не са установени големи разлики в дзета-потенциалите при натоварените и натоварените с EPI частици (Фиг. 47а). Всички дзета-потенциали са отрицателни, със стойности от $-0,9$ mV при PBCA до -25 mV при PBCA/PSMA частиците, съдържащи повече от 20 wt% PSMA. Присъствието на амфифилния полианионен PSMA компонент повишава абсолютната стойност на отрицателния дзета-потенциал и подобрява електростатичната стабилизация на дисперсията. Дори само 5% PSMA в PBCA/PSMA частиците променя значително дзета-потенциала от $-0,9$ mV (при PBCA) до -15 mV. Този ефект върху електрокинетичните свойства на частиците се дължи вероятно на

отлагането на амфифилния PSMA компонент на повърхността на частиците и получаване на обогатена на PSMA обвивка около по-богатата на ПВСА вътрешност на частиците (Фиг. 47б).

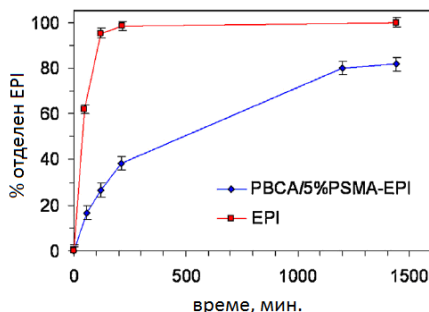
Получаването на външната обвивка от албумин се осъществява чрез диспергиране на ПВСА/PSMA частиците в разтвор на албумин (10 mg/ml) и няколкоминутна обработка с ултразвук при стайна температура. Свидетелства за образуването на албуминова обвивка са следните наблюдения. Първо, нестабилните дисперсии на EPI-PBCA/PSMA (получаващи се при PSMA<20%) стават стабилни след прибавяне на албумина, при което агрегатите се диспергират до отделни частици. Второ, електрокинетичните характеристики на частиците значително се променят в присъствие на албумин. Например, EPI-PBCA/10%PSMA се характеризират със дзета-потенциал от $-18,0 \pm 0,6$ mV, който се променя в присъствие на албумин (при еднакви други условия) до $-10,7 \pm 0,6$ mV. Понижената абсолютна стойност на потенциала и едновременно повишената стабилност е индикация за това, че ПВСА/PSMA наночастиците са стабилизиращи от адсорбирани по повърхността им албуминови молекули (в противен случай, намаляването на абсолютната стойност на дзета-потенциала на електростатично стабилизиращи частици би довело до допълнителна дестабилизация). Частиците ПВСА/PSMA в отсъствие на албумин са само електростатично стабилизиращи (от анионните карбоксилати от PSMA) и агрегират в среда с голяма йонна сила. Тези наблюдения потвърждават хипотезата за мултислойна структура на албумин-стабилизиращите ПВСА/PSMA частици (Фиг. 47б). Добавянето на албумин към дисперсиите на EPI-PBCA частици не подобрява стабилността им и при съхранение за една седмица при 4°C. Частиците EPI-PBCA в присъствие на 10 mg/ml албумин образуват агрегати и седиментират, докато албумин-стабилизиращите EPI-PBCA/5%PSMA частици остават стабилни при същите условия. Това се обяснява с по-силното взаимодействие на албумина с PSMA от повърхността на ПВСА/PSMA частиците в сравнение с ПВСА. По този начин, използването на само 5% PSMA в състава на ПВСА/PSMA частиците осигурява стабилността им в албумин-съдържащи среди с физиологична йонна сила.

Наночастиците EPI-PBCA/5%PSMA се характеризират с голяма степен на лекарствено натоварване (95%), добра колоидна стабилност в присъствие на албумин, при което дзета-потенциалът им е $-11,8 \pm 0,9$ mV (pH 7,4, йонна сила 0,15 M; 37°C), а средният им размер (DLS, z-average) е 198 nm (PDI 0,11). EPI от тази формулировка показва забавено освобождаване при изследване с диализен метод в

сравнение с EPI.HCl (Фиг. 48). Около 40% от съдържащия се във формулировката EPI се освобождава в първите 3 ч и 80% в следващите 20 ч във физиологичен разтвор.



Фиг. 47. а) Ефект на wt% на PSMA в PBCA/PSMA частиците върху дзета-потенциалите (при pH 7,4, 37°C и йонна сила 0,15 M) на ненатоварени и натоварени с EPI частици ; б) предполагаема структура на EPI-PBCA/PSMA частици, стабилизирани с албумин (Angelova and Yordanov 2015).



Фиг. 48. Профил на освобождаване на EPI при 37°C в 0,9% NaCl, определен чрез диализен метод (Angelova and Yordanov 2015).

Изследване на ефекта на частиците върху клетъчната мембрана на еритроцити показва, че инкубацията за един час с 0,4 mg/ml частици EPI-PBCA/5%PSMA не повлиява осмотичната резистентност на еритроцитите.

Резюме на основните резултати

1. Получени са стабилизирани с полуксамер 188 ПВСА наночастици чрез емулсионна полимеризация и са изучени ефектите на различни параметри върху характеристиките на наночастиците. Установено е, че размерът на частиците може да се контролира чрез концентрациите на използваният мономер (ВСА) и лимонена киселина (СА). Установено е, че получените частици са цитотоксични спрямо клетки от цервикален карцином (HeLa) с инхибиторна концентрация IC_{50} от 30 $\mu\text{g/ml}$, при което предизвикват ядрена фрагментация и морфологични изменения в клетките.

2. Флуоресцентно-маркирани колоидни частици от РЕСА са получени чрез емулсионна полимеризация и натоварване с флуоресцентното багрило Родамин 6G. Частиците са с размери 200-300 nm и отрицателен дзета-потенциал (около $-3,0 \pm 0,5 \text{ mV}$). Намерено е, че степента на натоварване с Родамин 6G се увеличава с повишаване на концентрацията на мономер в полимеризационната среда. Установено е отместване към дългите вълни на флуоресцентния спектър на Родамин 6G след вграждането му в РЕСА частиците. Намерено е, че багрилото се отделя много бавно от частиците във физиологичен буфер, което е важна предпоставка за потенциалното им приложение.

3. Получена е нова формулировка на цефалексин (CPX) на основата на частици от РЕСА в качеството на колоидна система за доставяне на антибиотик. Лекарство-натоварените частици CPX-РЕСА са получени чрез емулсионна полимеризация в разтвор на цефалексин. Частиците са с размери около 400-500 nm. Дзета-потенциалът е слабо положителен при лекарство-натоварените частици и слабо отрицателен при ненатоварените РЕСА частици. Натоварването на цефалексин чрез адсорбция е с ниска ефективност (2 %), докато натоварването при полимеризация в цефалексинов разтвор води до получаване на частици CPX-РЕСА с високо лекарствено съдържание (21 wt%).

4. Получени са ПВСА наночастици, натоварени с ципрофлоксацин (CIP) чрез емулсионна полимеризация без ползване на ацетон. Установено е, че CIP-ПВСА частиците са с размери около 240 nm. Определено е, че степента на лекарствено натоварване зависи от концентрациите на CIP и мономер (ВСА) и достига до 45 %. Установено е, че CIP-ПВСА формулировката съдържа олигомерен ПВСА и около 30% от натовареното лекарство е силно асоциирано с полимерния

носител. Антибактериалната активност на СІР-РВСА е приблизително колкото тази на СІР. Частиците СІР-РВСА са стабилни при съхранение за минимум 25 дни при 4°C. Съхранението при стайна температура води до намаляване на лекарственото натоварване, вероятно в резултат на ерозия на частиците. Установено е, че скоростта на лекарствено освобождаване зависи от рН.

5. Получени са нови колоидни формулировки на антимикотика еконазол (ECN) на основата на РВСА наночастици чрез нанопреципитация и емулсионна полимеризация в присъствие на различни стабилизатори (декстран 40, полисорбат 80 и полксамер 188). Установено е, че наночастиците, получени чрез полимеризационен метод, са по-малки (~120 nm) и с по-голямо лекарствено съдържание от тези, получени чрез нанопреципитация (~230 nm), докато вида на стабилизатора не оказва съществен ефект върху размера и лекарственото натоварване. Формулировките, стабилизирани с полксамер 188 и полисорбат 80, са относително по-стабилни от тези, стабилизирани с декстран 40. Частиците, получени чрез нанопреципитация, са относително по-стабилни от тези, получени чрез полимеризация.

6. Получени са нови формулировки на противораковото лекарство хлорамбуцил (СНL) на основата на РВСА наночастици чрез емулсионна полимеризация в присъствие на полксамер 188. Размерът на получените частици е 220–250 nm, докато частици, получени в присъствие на декстран 40, са относително нестабилни и с по-големи размери (400–500 nm). Лекарственото съдържание в СНL-РВСА е около 6–10%. Съхранението на формулировките в замразено състояние (–20°C) се оказва необходимо за предотвратяване хидролизата на хлорамбуцила.

7. Наночастици от РВСА, както и натоварени с хлорамбуцил СНL-РВСА частици, стабилизирани с декстран 40, полисорбат 80 и полксамер 188, са получени чрез нанопреципитация от предварително синтезиран полимер (РВСА). Размерът на частиците е в интервала от 200 до 300 nm и може да се контролира чрез концентрацията на използвания полимер. В сравнение с полимеризационните методи, нанопреципитацията има предимството, че се използва предварително получен и добре охарактеризиран полимер, чиито характеристики не зависят от условията, при които се получават частиците. Методът е подходящ за вграждане на хидрофобни вещества във вътрешността на РВСА частици. Също така, методът предлага възможност за получаване на малки по размери (~200 nm) декстран-стабилизирани

CHL-PBCA частици, които при дисперсионна полимеризация се получават с по-големи размери (~490 nm).

8. Получени са нови колоидни формулировки на цитостатика етопозид (ЕТО) на основата на PBCA наночастици чрез емулсионна полимеризация в присъствие на полисорбат 80 и полоксамер 188. Установени са високи степени на лекарствено натоварване (до 70%) и отрицателни стойности на дзета-потенциалите във физиологичен буфер. Получените формулировки на етопозид индуцират апоптоза в аденокарциномни клетки (A549), при което формулировката ЕТО-PBCA-P80 проявява най-висока цитотоксичност.

9. Натоварени с епирубицин наночастици EPI-PBCA са получени чрез емулсионна полимеризация в система вода/ацетон в присъствие на декстран 40 и полоксамер 188. Използването на ацетон позволява по-добро диспергиране на мономера в полимеризационната среда и получаване на относително по-малки частици (250 nm) в сравнение с аналогична процедура без използване на ацетон. Частиците, получени в присъствие на декстран 40, са стабилни при съхранение за поне 2 месеца при 4°C и се характеризират с по-висока степен на лекарствено натоварване в сравнение с полоксамер-стабилизираните частици. Степента на натоварване намалява, докато лекарственото съдържание се увеличава при повишаване концентрацията на EPI в полимеризационната среда. Частиците EPI-PBCA са с положителен дзета-потенциал. Натовареният в частиците EPI е здраво асоцииран с носителя, което забавя освобождаването му.

10. Натоварени с епирубицин частици EPI-PBCA са получени чрез нанопреципитационен метод. Увеличаването на рН на средата до рН 7,4 води до увеличаване на степента на лекарствено натоварване. Частици с по-голямо лекарствено съдържание могат да се получат при по-високи концентрации на EPI.HCl. Присъствието на полисорбат 80 увеличава цитотоксичността към HeLa клетки.

11. Натоварени с епирубицин наночастици от EPI-PBCA са получени чрез преполимеризация. Частиците са с размери около 250 nm. Степента на натоварване е около 60-70% и не зависи значително от количеството на EPI. Лекарственото съдържание се увеличава при увеличаване концентрацията на EPI. Дзета-потенциалите при рН 7,4 при полоксамер-стабилизираните EPI-PBCA частици зависят от лекарственото съдържание, като са отрицателни при PBCA частиците и са положителни при EPI-PBCA частиците с голямо лекарствено съдържание. Частиците с полисорбат 80 и по-голямо лекарствено

съдържание са относително по-малко стабилни. Частиците EPI-PBCA са по-цитотоксични от натоварения в частици EPI към A549 клетки и по-малко токсични спрямо EPI при HeLa клетки. Наблюдения с флуоресцентен микроскоп показват, че натовареният епирубицин се локализира в ядрата на клетките, докато EPI-PBCA частиците се локализира в ендозомни везикули в цитоплазмата, което е потвърдено от наблюдения с трансмисионен електронен микроскоп.

12. Получени са количествени данни за взаимодействията между PBCA и EPI-PBCA наночастици с протеин-модифицирани повърхности чрез SPR техника. Предложената методология е подходяща за измерване на взаимодействията между наночастици и протеини чрез определяне скоростните константи на асоциация/дисоциация и равновесните константи на взаимодействията. Установено е, че взаимодействието на EPI-PBCA с фибриноген е по-силно, отколкото с албумин и IgG.

13. Получени са колоидни формулировки на EPI на основата на наночастици от поли(стирен-с α -малеинова киселина) (PSMA). Размерът на частиците (от 100 до 320 nm) може да се контролира чрез количеството на PSMA и съотношението ацетон/буфер, използвани при нанопреципитацията. Частиците са натоварени с EPI чрез сорбция. Дзета-потенциалите на частиците са отрицателни (около -28 mV) и се променят значително (до -15 mV) в присъствие на серумен албумин. Частиците са стабилни при pH от 4,5 до 9,3.

14. Нови наночастици от типа ядро/обвивка от PBCA/PSMA са получени чрез нанопреципитация, натоварени с епирубицин чрез сорбция и стабилизирани с албумин. Увеличаването на съотношението PSMA/PBCA в състава на частиците води до намаляване на размера им (от 200 до 100 nm) и увеличаване на абсолютната стойност на отрицателните им дзета-потенциали (от $-0,9$ до -27 mV). Съдържанието на 5 wt% PSMA в PBCA/PSMA частиците води до значително увеличаване на стабилността на дисперсията и промяна в дзета-потенциала в сравнение с PBCA частиците. Този ефект върху електрокинетичните свойства се обяснява с отлагането на амфифилните молекули на PSMA на повърхността на PBCA/PSMA частиците. Степента на натоварване на епирубицин е около 95%. Адсорбцията на човешки серумен албумин (HSA) води до стабилизация на EPI-PBCA/PSMA частиците във физиологичен буфер. Епирубицинът проявява забавено освобождаване от EPI-PBCA/PSMA частиците. Установено е, че тези частици не повлияват осмотичната резистентност на еритроцитите.

Приноси

I. Приноси върху разработването на колоидни формулировки на основата на полиалкилцианоакрилатни (PACA) наночастици:

1. Получени са нови колоидни формулировки на цефалексин, ципрофлоксацин, еконазол, хлорамбуцил и етопозид чрез натоварване на лекарствените вещества в наночастици от PECA и/или PVCА. Получени са резултати относно ефектите на различни експериментални параметри и условия на получаването върху характеристиките на наночастиците.

2. Приложен е методът нанопреципитация за получаване на различни PVCА частици натоварени с хлорамбуцил, еконазол и епирубицин. Този метод позволява контрол върху характеристиките на полимера и избягване на химически взаимодействия между мономерите и лекарствените молекули, което не винаги може да се реализира в условията на рутинно използваната емулсионна полимеризация.

3. Успешно приложени са методите на полимеризация в система от разтворители и преполимеризацията при получаването на епирубицин-натоварени PVCА наночастици, което позволява по-добро диспергиране на мономера и получаване на монодисперсни частици, натоварени с епирубицин.

4. Получени са нови данни относно взаимодействията между епирубицин-натоварени PVCА наночастици и протеини от кръвна плазма чрез измервания с повърхностен плазмон резонанс (SPR) техника.

5. Получени са флуоресцентни PECA наночастици чрез натоварване с флуорофора Родамин 6G. Направена е оценка на ефектите на флуорофора върху свойствата на наночастиците.

II. Приноси върху разработването на колоидни формулировки на основата на поли(стирен-съ-малеинова киселина) (PSMA):

6. Наночастици на основата на PSMA са получени чрез нанопреципитация и са предложени като нови наноносители за епирубицин. Получени са резултати относно ефектите на различни параметри върху характеристиките на наночастиците, което е от значение за

постигане на контрол върху производствения процес и постоянство при получаването.

7. Получени са нови, стабилизирани с албумин, наночастици с висока ефективност на натоварване с епирубицин на основата на PBCA и PSMA със структура от типа ядро/обвивка.

Литература

- Alonso, M. J., A. Sanchez, D. Torres, et al. 1990, *J. Microencapsulation* 7:517.
- Arias, J.L., V. Gallardo, M. Ruiz, A. Delgado. 2008, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69:54.
- Balland, O., H. Pinto-Alphandary, et al. 1994, *J. Antimicrob. Chemother.* 33:509.
- Blagoeva, P., R. Balansky, T. Mircheva, M. Simeonova. 1992, *Mutat. Res.* 268:77.
- Canovi, M., J. Lucchetti, M. et al. 2012, *Sensors*12:16420.
- Charreyre, M., P. Zhang, et al. 1995, *J. Colloid Interf. Sci.* 170:374.
- Chatterji, D., R. Yeager, J. Gallelli. 1982, *J. Pharm. Sci.* 71:50.
- Coukell, A., D. Faulds. 1997, *Drugs* 53:453.
- De Juan, B., von Briesen H., Gelperina S., Kreuter J. 2006, *J. Drug Target.* 14:614.
- Dillen, K, Vandervoort J, Van den Mooter G, et al. 2004, *Int. J. Pharm.* 275:171.
- Dillen, K, Vandervoort J, Van den Mooter G, et al. 2006, *Int. J. Pharm.* 314:72.
- Douglas, S. J., L. Illum, S. Davis, J. Krueter. 1984, *J. Colloid Interf. Sci.* 101:149.
- Douglas, S., S. Davis, S.R. Holding. 1985, *Br. Polymer J.* 17:339.
- Douglas, S., Illum L., Davis S. 1985a, *J. Colloid Interface Sci.* 103:154.
- Douglas, S., L. Illum, S. Daviss. 1986, *J. Control. Release* 3:15.
- Fattal, E., M. Youssef, P. et al. 1989, *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 33:1540.
- Fawaz, F, Guyot M, Laguény A, Devissaguet J. 1997, *Int. J. Pharm.* 154:191.
- Fawaz, F., F. Bonini, J. Maugein, A. Laguény. 1998, *Int. J. Pharm.* 168:255.
- Fridman, J., Lowe S. 2003, *Oncogene* 22:9030.
- Göppert, T. and R. Müller. 2005, *Int. J. Pharm.* 302:172.
- Greish, K., T. Sawa, J. Fang, T. Akaike, H. Maeda. 2004, *J. Control. Release* 97:219.
- Greish, K., A. Nagamitsu, J. Fang, and H. Maeda. 2005, *Bioconjugate Chem.* 16:230.
- Gulyaev, A., B. Ermekbaeva, G. Kivman, et al. 1998, *Pharm. Chem. J.* 32:3.
- Hillaireau, H., and P. Couvreur. 2009, *Cell. Mol. Life Sci.* 66:2873–2896.
- Hodes, M., C. Palmer, A. Warren. 1960, *Exp. Cell Res.* 21:164.
- Jalila, M.R., M. Baschini, K. Sapag. 2015, *Appl. Clay Sci.* 114:69.
- Jeong, Y., Na H., Seo D., Kim D., Lee H., Jang M., et al. 2008, *Int. J. Pharm.* 352:317.
- Kante, B., P. Couvreur, G. Dubois-Krack, et al. 1982, *J. Pharm. Sci.* 71:786.
- Kobayashi, M., T. Oda, H. Maeda. 1988, *J. Bioact. Compat. Polym.* 3:319.
- Kreuter, J., R. Alyautdin, D. Kharkevich. 1995, *Brain Res.* 674:171.
- Kumar, PV, Jain NK. 2007, *AAPS PharmSciTech* 8: article 17.
- Lenaerts, V., P. Couvreur, D. Christiaens-Leyh, et al. 1984, *Biomaterials* 5:65.
- Li-Blatter, X., P. Nervi, A. Seelig. 2009, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1788:2335.
- Maeda, H., T. Sawa, T. Konno. 2001, *J. Control. Release* 74:47.
- Menna, P., O. Paz, M. Chello, E. Covino, et al. 2012, *Expert Opin. Drug Saf. Suppl* 1:S21.
- Miyazaki, S., A. Takahashi, W. Kubo, et al. 2003, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 6:238.
- Muller, R., C. Lherm, J. Herbort, P. Couvreur. 1990, *Biomaterials* 11:590.

Nagao, D., N. Anzai, Y. Kobayashi, S. Gu, M. Konno. 2006, *J. Colloid Interf. Sci.* 298:232.

Nicolas, J., P. Couvreur. 2009, *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 1:111.

Page-Clisson, M.-E., H. Pinto-Alphandary, et al. 1998, *J. Control. Release* 56:23.

Page-Clisson, M, Gibaud S, et al. 1998a, *Int. J. Pharm.* 166:117.

Pinto-Alphandary, H., et al. 2000, *Int. J. Antimicrob. Agents* 13:155.

Poupaerta, J., P. Couvreur. 2003, *J. Control. Release* 92:19.

Sahay, G., D. Alakhova, and A. Kabanov. 2010, *J. Control. Release* 145:182.

Sharma, P., S. Ganta, W. Denny, S. Garg. 2009, *Int. J. Pharm.* 367:187.

Soma E., Attali P., Merle P. 2012. In: Alonso MJ, Csaba NS, editors. *Nanostructured biomaterials for overcoming biological barriers*, p. 591.

Tulkens, P.M. 1991, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 10:100.

Vauthier, C., C. Dubernet, E. Fattal, et al. 2003, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:519.

Veizin, W, Florence A. 1980, *J. Biomed. Mater. Res.* 14:93.

Vos, W., F.A.M. Leermakers, A. de Keizer, et al. 2010, *Langmuir* 26:249.

Wang, J.-H., J. Bartlett, A. Dunn, et al. 2005, *J. Microscopy* 217:216.

Wohlfart, S., A. Khalansky, et al. 2011, *Int. J. Pharm.* 415:244.

Yang, S., H. Ge, Y. Hu, X. Jiang, C. Yang. 2000, *J. Appl. Polym. Sci.* 78:517.

Zhou, Q., X. Sun, L. Zeng, J. Liu, Z. Zhang. 2009, *Nanomedicine: NBM* 5:419.

Научни публикации

в които са представени резултати от дисертационния труд

Глави от книги (в международни редактирани издания):

1. Yordanov, G. 2013. Advanced strategies for drug delivery in nanomedicine. In: P. Kralchevsky, R. Miller, F. Ravera (Eds.) Colloid and Interface Chemistry for Nanotechnology, pp. 3-36, CRC Press.
2. Yordanov, G. 2014. Nanocarriers for antibiotics. In: S.R. Garg (Ed.) Nanotechnology for Animal Health and Production, pp. 124-134, Daya Publishing House, New Delhi.

Статии в индексирани списания (SCOPUS):

3. Yordanov, G., C. Dushkin. 2010. Preparation of poly(butylcyanoacrylate) drug-carriers by nanoprecipitation using a pre-synthesized polymer and different colloidal stabilizers, Colloid Polymer Science 288:1019–1026 (Springer).
4. Yordanov, G., Z. Bedzhova, C. Dushkin. 2010a. Preparation and physicochemical characterization of novel chlorambucil-loaded nanoparticles of poly(butylcyanoacrylate), Colloid Polym. Sci. 288:893-899 (Springer).
5. Yordanov, G., N. Abrashev, C. Dushkin. 2010c. Poly(n-butylcyanoacrylate) submicron particles loaded with ciprofloxacin for potential treatment of bacterial infections. Progr. Colloid Polym. Sci. 137:53–59. (Springer)
6. Yordanov, G., Z. Bedzhova. 2011. Poly(ethyl cyanoacrylate) colloidal particles tagged with Rhodmine 6G: preparation and physicochemical characterization. Cent. Eur. J. Chem. 9(8):1062–1070. (indexed in Scopus)
7. Yordanov, G. 2012b. Development of cephalixin-loaded poly(ethyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres, Central Eur. J. Chem. 10: 305-312 (Springer).
8. Yordanov, G., R. Skrobanska, and A. Evangelatov. 2012. Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: formulation development and in vitro studies on cancer cell lines. Colloids Surf. B 92:98–105.
9. Yordanov, G. 2012c. Influence of the preparation method on the physicochemical properties of econazole-loaded poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanoparticles, Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 413:260-265 (Elsevier).
10. Bedzhova, Z., G. Yordanov. 2013. Preparation of epirubicin-loaded poly(butyl cyanoacrylate) colloidal particles by polymerization in a mixed organic-aqueous solvent system, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 431:27-33 (Elsevier).
11. Yordanov, G., A. Evangelatov, R. Skrobanska. 2013a. Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Preparation and in vitro evaluation in human lung adenocarcinoma cells, Colloids Surfaces B: Biointerfaces 107:115-123 (Elsevier).

12. Yordanov, G., R. Skrobanska, A. Evangelatov. 2013b. Colloidal formulations of etoposide based on poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation, physicochemical properties and cytotoxicity, *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* 101:215-222 (Elsevier).
13. Angelova, N., G. Yordanov. 2014a. Nanoparticles of poly(styrene-co-maleic acid) as colloidal carriers for the anticancer drug epirubicin, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 452:73-81 (Elsevier).
14. Angelova, N., G. Yordanov. 2015. Albumin-stabilized epirubicin nanocarriers of core-shell type based on poly(butyl cyanoacrylate) and poly(styrene-co-maleic acid), *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 487:232-239 (Elsevier).
15. Evangelatov, A., R. Skrobanska, N. Mladenov, M. Petkova, G. Yordanov, R. Pankov. 2016. Epirubicin loading in poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles manifests via altered intracellular localization and cellular response in cervical carcinoma (HeLa) cells, *Drug Deliv.* 23:2235–2244.
16. Yordanov, G., R. Skrobanska, M. Petkova, 2016a. Poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilised with poloxamer 188: particle size control and cytotoxic effects in cervical carcinoma (HeLa) cells, *Chemical Papers* 70:365–374.
17. Yordanov, G., J. Katrlík, P. Gemeiner. 2016b. Study of interactions between blood plasma proteins and poly(butyl cyanoacrylate) drug nanocarriers by surface plasmon resonance, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 510:309–316. (Elsevier).

Статии в неиндексиран издания

18. Yordanov, G. 2009. Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation and biomedical applications, *International Exchange Programs Guest Lecture Series No. 6*, Meiji University Press, Tokyo, Japan.
19. Yordanov, G., Z. Bedzhova, C. Dushkin. 2009. Poly(ethylcyanoacrylate) nanoparticles loaded with two organic fluorophores: preparation and physicochemical characterization, *Nanoscience and Nanotechnology*, E. Balabanova, I. Dragieva (eds.), vol. 9, p. 65-67.
20. Bedzhova, Z., G. Yordanov, C. Dushkin. 2009. Preparation and characterization of dextran-coated colloidal particles of poly(butylcyanoacrylate) loaded with the antiproliferating agent chlorambucil, *Scientific researches of the Union of Scientists in Bulgaria-Plovdiv, series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine*, Vol. XI, ISSN 1311-9427, *Medicine and Stomatology Session*, 5-6 November 2009, pp. 138-141.
21. Yordanov, G., Z. Bedzhova, C. Dushkin. 2010b. The effect of preparation method on the size distribution of poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles loaded with chlorambucil, *Nanoscience and Nanotechnology*, E. Balabanova, I. Dragieva (eds.), vol. 10, p. 162–165.
22. Yordanov, G., N. Abrashev, C. Dushkin. 2010d. Ciprofloxacin-loaded poly-(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: formulation stability and antibacterial

- activity. *Nanoscience & Nanotechnology*, 10, E. Balabanova, I. Dragieva (Eds.), Sofia, 2010, pp. 158–161.
23. Yordanov, G., C. Dushkin. 2011. Entrapment of anticancer drugs in poly-(alkyl cyanoacrylate) colloidal particles by nanoprecipitation approach, *Annual of “Konstantin Preslavsky” University of Shumen. Natural Sciences. Chemistry*, vol. XXI B1, 173-182.
 24. Dushkin, C., G. Yordanov. 2011. Recent advances in the preparation of drug-loaded poly(alkyl cyanoacrylate) colloidal particles for cancer treatment: nanoprecipitation vs. polymerization, *Nanoscience and Nanotechnology*, E. Balabanova, I. Dragieva (eds.), vol. 11, p. 58-61.
 25. Angelova, N., G. Yordanov. 2014b. Nanopharmaceutical formulations based on poly(styrene-co-maleic acid), *Bulgarian Journal of Chemistry* 3:33–43.
 26. Yordanov, G. 2012a. Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles as drug carriers: 33 years later. *Bulg. J. Chem.* 1:61–73.

Участия в научни конференции

на които са представени резултати от дисертационния труд

1. G. Yordanov, Z. Bedzhova, C. Dushkin, "Poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles loaded with Rhodamine 6G: preparation and physicochemical characterization", 10-th Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, November 27-28, 2008, Sofia, Bulgaria (poster presentation – awarded for excellent presentation).
2. G. Yordanov, C. Dushkin, "Polymer nanoparticles for targeted delivery and controlled release of antibiotics", 8-th National Scientific Conference in Chemistry for Students and PhD-Students, 20-21 May, 2009, Sofia, Bulgaria (oral presentation).
3. G. Yordanov, C. Dushkin, "Colloidal nanoparticle carriers for targeted drug delivery", Nanoparticles for drug delivery and cell exploration (3-rd Meeting of Workgroup 2 of COST Action D43), 22-23 May 2009, Villa La Rocca at the University of Bari, Bari, Italy (oral presentation).
4. G. Yordanov, C. Dushkin, "Development of nanoparticles loaded with antibiotics for potential treatment of bacterial infections", ECIS 2009 & 3-rd COST D43 Workshop, 6-11 September, Antalya, Turkey (oral presentation).
5. Z. Bedzhova, G. Yordanov, C. Dushkin, "Preparation and physicochemical characterization of poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles loaded with chlorambucil", 11-th Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, October 01-03, 2009, Varna, Bulgaria (poster presentation).
6. G. Yordanov, N. Abrashev, C. Dushkin, "Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles loaded with ciprofloxacin: preparation, physicochemical characterization and antibacterial activity", 11-th Workshop on Nanoscience and Nanotechnology, October 01-03, 2009, Varna, Bulgaria (poster presentation).
7. Z. Bedzhova, G. Yordanov, C. Dushkin, "Preparation and characterization of dextran-coated colloidal particles of poly(butylcyanoacrylate) loaded with the antiproliferating agent chlorambucil", Annual Scientific Conference of the Union of Bulgarian Scientists, November 5-6, 2009, Plovdiv, Bulgaria (oral presentation).
8. G. Yordanov, "Recent advances in the preparation of nanoparticles loaded with eukaryotic type II topoisomerase inhibitors for cancer therapies", 4-th Meeting of Workgroup 2 of COST Action D43, 20-21 May 2010 at Ecole Polytechnique Federale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland (oral presentation).
9. Z. Bedzhova, G. Yordanov, C. Dushkin, "Synthesis of poly(butyl cyanoacrylate) by Knoevenagel condensation", 8-th Chemistry Conference, 18-19 June, 2010, Koprivshtitsa, Bulgaria (poster presentation).
10. Z. Bedzhova, G. Yordanov, C. Dushkin, "Colloidal poly(butyl cyanoacrylate) particles prepared by polymerization and nanoprecipitation: a comparative study of methods", COST D43 Thematic Symposium – Colloidal Dispersions in Nanoscience, 14-15 July, 2010, Borovets, Bulgaria (poster presentation).
11. G. Yordanov, C. Dushkin, "Nanoprecipitation approach in the preparation of poly(alkyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres", COST D43 Thematic

Symposium – Colloidal Dispersions in Nanoscience, 14-15 July, 2010, Borovets, Bulgaria (oral presentation).

12. G. Yordanov, Z. Bedzhova, C. Dushkin, “Epirubicin-loaded poly(butyl cyanoacrylate) colloidal particles coated with Polysorbate 80”, COST D43 Workshop, 6–7 September, 2010, Prague, Czech Republic (poster presentation, P7.7).

13. G. Yordanov, C. Dushkin, “Development of etoposide-loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanocapsules”, COST D43 Workshop, 6–7 September, 2010, Prague, Czech Republic (oral presentation, O7.11).

14. G. Yordanov, C. Dushkin, “Development of poly(n-butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres loaded with lipophilic anticancer drugs intended for targeted drug delivery”, Second workshop on size-dependent effects in materials for environmental protection and energy application (SizeMat-2), 19-21 September, 2010, Nessebar, Bulgaria (oral presentation, OP 10).

15. G. Yordanov, C. Dushkin, “Entrapment of anticancer drugs in poly(alkyl cyanoacrylate) colloidal particles by nanoprecipitation approach”, IX National conference with international participation Natural Sciences ‘2010 (NCNS2010), 24-26 September, Varna, Bulgaria (poster presentation).

16. G. Yordanov, C. Dushkin, “Poly(butyl cyanoacrylate) nanospheres and nanocapsules loaded with etoposide: preparation, physicochemical characterization and drug release”, 12th Workshop Nanoscience & Nanotechnology 2010, 26-28 November, 2010, Varna, Bulgaria (oral presentation).

17. G. Yordanov, R. Skrobanska, C. Dushkin, R. Pankov, “The effect of polysorbate 80 on the cytotoxicity of epirubicin and epirubicin-loaded poly(butyl cyanoacrylate) colloidal particles”, Workshop of COST Action D43 Functionalized Materials and Interfaces, Organized by Department of Physical-Chemistry II, Faculty of Pharmacy of Complutense University of Madrid, March 30 – April 1, 2011, Madrid, Spain (oral presentation).

18. G. Yordanov, “Development of poly(butyl cyanoacrylate) colloids as carriers for the antifungal drug econazole”, 25-th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2011), 4-9 September, 2011, Berlin, Germany (poster presentation).

19. G. Yordanov, “Poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres loaded with cephalexin: preparation, physicochemical characterization and drug release”, 13th Workshop Nanoscience & Nanotechnology 2011, 25-26 November, 2011, Sofia, Bulgaria (poster presentation).

20. G. Yordanov, “Interactions between Proteins and Nanoparticles”, 13th Workshop Nanoscience & Nanotechnology 2011, 25-26 November, 2011, Sofia, Bulgaria (oral presentation).

21. M. Petkova, R. Skrobanska, G. Yordanov, “Cytotoxic and antiproliferative effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in vitro”, 11-th National Scientific Conference in Chemistry for Students and PhD-Students, 14-16 May, 2012, Sofia, Bulgaria (oral presentation).

22. G. Yordanov, R. Skrobanska, A. Evangelatov, “Epirubicin-loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: formulation and in vitro studies on cervical carcinoma cells”, Workshop "Nano-biocolloidal materials and non-equilibrium

- self-assembly", Joint Meeting of WG 3 and WG 4, COST Action CM1101, 18-19 June 2012, Barcelona, Spain (oral presentation).
23. G. Yordanov, P. Gemeiner, J. Katrlík, "Investigation of the interactions between plasma proteins and polymeric colloidal drug carriers by SPR technique", Colloids and Nanomedicine 15-17 July 2012, Amsterdam, The Netherlands (poster presentation).
24. G. Yordanov, R. Skrobanska, A. Evangelatov, "Recent advances in the preparation of anthracycline-loaded colloidal nanoparticles for cancer chemotherapy", 26-th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2012), 2-7 September, 2012, Malmö, Sweden (oral presentation).
25. J. Katrlík, P. Gemeiner, G. Yordanov, „Study of interaction of human plasma proteins with polymeric nanoparticles as drug carriers with surface plasmon resonance“, 26-th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2012), 2-7 September, 2012, Malmö, Sweden (poster presentation).
26. G. Yordanov, "New anticancer drug formulations based on poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles", International Workshop on Nanoscience and Nanotechnologies, 27/28 May 2013, Sofia, Bulgaria.
27. G. Yordanov, "Potentials, possibilities and challenges in pharmaceutical nanotechnologies", V-th Scientific Conference „Challenges in modern chemistry and Pharmacy“, 20 November, 2013, Sofia, Bulgaria.
28. M. Petkova, R. Skrobanska, A. Evangelatov, G. Yordanov, "Cytotoxic and anti-proliferative effect of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles on normal and tumor cells in vitro“, 27-th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2013), 1-6 September, 2013, Sofia, Bulgaria (poster presentation).
29. G. Yordanov, A. Evangelatov, R. Skrobanska, "Epirubicin loaded to pre-polymerized poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: Preparation and in vitro evaluation in human lung adenocarcinoma cells“, 27-th Conference of the European Colloid and Interface Society (ECIS 2013), 1-6 September, 2013, Sofia, Bulgaria (poster presentation).
30. G. Yordanov, "Interactions between nanoparticle drug carriers and cancer cells“, 16th International Workshop in Nanoscience and Nanotechnology, Sofia, 7-8 November 2014 (oral presentation).

Поканени лекции:

31. G. Yordanov, Poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles: preparation and biomedical applications, invited lecture at the highly academic seminar for faculty and graduate students at Meiji University, November 6, 2009, Japan.
32. G. Yordanov, Preparation of polybutylcyanoacrylate colloidal particles by nanoprecipitation, invited lecture at the scientific seminar of the Institute of polymers, Bulgarian Academy of Sciences, March 18, 2011, Sofia, Bulgaria.
33. G. Yordanov, Colloidal nanoparticles for drug delivery: basic concepts and future perspectives, invited lecture at the scientific seminar of the Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, September 26, 2011, Bratislava, Slovakia.