

О. С. Елизарова<sup>1</sup>, В. Ю. Балабаньян<sup>3</sup>, Е. В. Шипуло<sup>2</sup>, О. О. Максименко<sup>2</sup>,  
Л. В. Ванчугова<sup>2</sup>, С. А. Литвинова<sup>1</sup>, Т. Л. Гарибова<sup>1</sup>, Т. А. Воронина<sup>1</sup>,  
С. Э. Гельперина<sup>2</sup>

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА У КРЫС НОВОЙ КОЛЛОИДНОЙ ФОРМЫ НИЗКОСИАЛИРОВАННОГО ЭРИТРОПОЭТИНА НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДОВ

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “НИИ Фармакологии им. В. В. Закусова” Российской академии медицинских наук, Москва, Россия;

<sup>2</sup> ООО “НПК “Наносистема”, Москва, Россия;

<sup>3</sup> ООО “Технология лекарств”, Москва, Россия

Целью настоящего исследования явилась разработка методики получения наносомальной формы низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека (нсРЭЧ), обладающей нейротропной антигеморрагической активностью. В ходе работы определены параметры сорбции эритропоэтина на наночастицах из гомополимера молочной кислоты или сополимеров молочной и гликолевой кислот, средние размеры наночастиц и агрегационная устойчивость полученного комплекса. Показано, что наиболее эффективная сорбция (более 80 %) достигается при использовании сополимера с равным соотношением молочной и гликолевой кислот (50/50). На модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс показано нейропротекторное действие наносомального нсРЭЧ, проявляющееся в его способности уменьшать гибель у экспериментальных животных (выжило 77,8 %, что на 40 % больше, чем в контрольной группе). В работе показано отсутствие влияния наносомального нсРЭЧ на гемопоэз при хроническом введении.

**Ключевые слова:** наночастицы; сополимер молочной и гликолевой кислот; эритропоэтин; нейропротекция; интрацеребральная посттравматическая гематома; гематокрит.

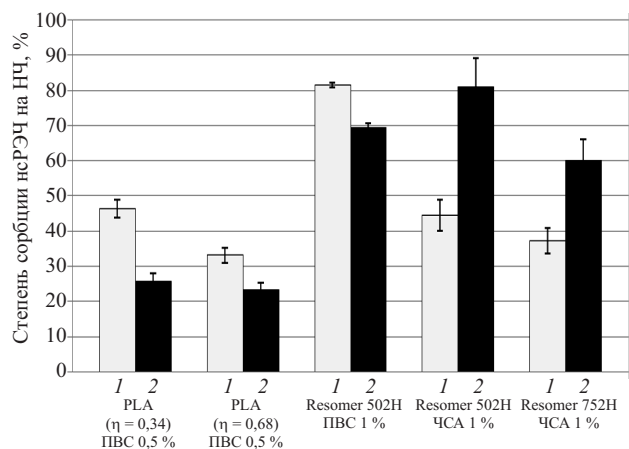
Одним из перспективных направлений поиска фармакотерапии нейродегенеративных заболеваний является использование пептидных факторов роста, в частности, рекомбинантного эритропоэтина человека (РЭЧ). В течение многих лет этот гемопоэтический ростовой фактор использовался для фармакологической коррекции анемий различного генеза за счет увеличения роста и дифференцировки эритроцитов. Существенным препятствием к клиническому применению РЭЧ в качестве нейропротектора является его влияние на эритропоэз и, как следствие, повышенный риск тромбообразования. Были разработаны производные РЭЧ с измененными фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, такие как: низкосиалированный РЭЧ (нсРЭЧ), асиалированный РЭЧ, карбамилированный РЭЧ, дарбепоэтин (ДЭПО) и карбамилированный ДЭПО, пептиды-миметики [1–3], однако широкого применения в неврологии они не нашли в связи с ограниченной способностью проникать через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ).

Доставка белков и пептидов в мозг — труднорешимая задача в фармации. Одним из решений такой задачи может стать использование наночастиц (НЧ) на основе биodeградируемых полимеров [4]. Для преодоления ГЭБ в основном используются полибутилцианоакрилатные (ПБЦА), полилактидные (полилактидная кислота, ПЛК), полилактид-ко-гликолидные (полилактидная-ко-гликолевая кислота, ПЛГК), альбуминовые и твердые липидные наночастицы [5–9]. Ранее уже

была показана способность ПБЦА НЧ [10] и ПЛГК микрочастиц [11] с РЭЧ оказывать нейропротекторное действие, а также были получены микрокапсулированные формы РЭЧ с контролируемым высвобождением [12]. Новизна настоящего исследования заключается в создании наносомальной формы нсРЭЧ (аналога мозгового эритропоэтина человека, Neuro-ЕРО) на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, позволяющей повысить транспорт нсРЭЧ через ГЭБ и не оказывающей влияния на кроветворение.

### Экспериментальная часть

В работе были использованы низкомолекулярные и высокомолекулярные гомополимеры молочной кислоты (PLA с вязкостью  $\eta = 0,34$  и  $0,68$  дл/г) марки Lactel® (Absorbable Polymers, DURECT Corporation, USA) и сополимеры молочной и гликолевой кислот (Resomer 502H и 752H) с различным соотношением звеньев молочной и гликолевой кислоты марки Resomer® (Boehringer Ingelheim, Germany); поверхностно-активные вещества (все — Sigma, USA): полочсамер 188 (Pluronic® F-68), поливиниловый спирт 30–70 кДа (ПВС), декстран (ММ 70 кДа) и человеческий сывороточный альбумин (ЧСА). Прочие растворители и реактивы были поставлены компанией Sigma (Сент-Луис, США). Низкосиалированный РЭЧ был предоставлен ООО “Протеиновый контур” (Россия). В качестве стандарта при определении влияния на кроветворение был использован препарат РЭЧ “Эральфон” 5000 МЕ (ЗАО “ФармФирма “Сотекс”, Россия).

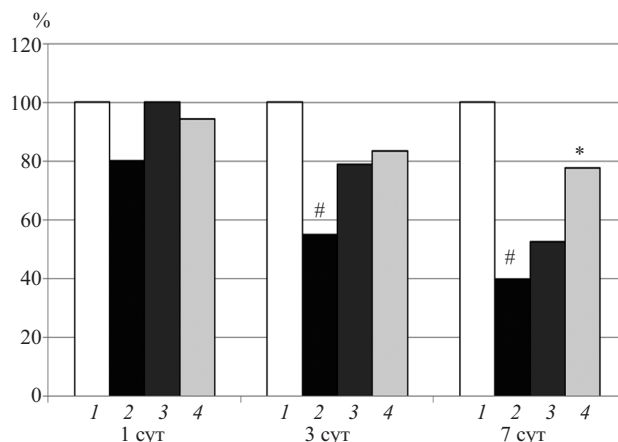


**Рис. 1.** Влияние наличия свободного ПАВ в инкубационной среде на эффективность сорбции нсРЭЧ на различных видах НЧ. 1 – НЧ отмыты от свободного ПАВ; 2 – НЧ от свободного ПАВ не были отмыты.

**Получение НЧ из различных полилактидов.** НЧ получали методом гомогенизации под давлением с последующим испарением органической фазы [13]. Раствор полимера (250 мг) растворяли в 5 мл дихлорметана, добавляли к 25 мл 0,5 – 1 % водного раствора ПВБ или ЧСА и гомогенизировали на гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA, Germany, 2 мин., 23600 об/мин) и далее 5 мин на гомогенизаторе EmulsiFlex C-5 (Avestin, Канада; 20000 – 25000 psi). Затем удаляли из полученной эмульсии дихлорметан в вакууме с помощью роторного испарителя Rotavapor R-210 (BUCHI, Германия), фильтровали, добавляли криопротектор (маннит, 1 %) и лиофильно высушивали (лиофильная сушка AlphaChrist 2 – 4 LSC, Германия). Размеры, полидисперсность и поверхностный заряд ( $\zeta$ -потенциалы) НЧ определяли с помощью наносайзера NanoZS (Malvern Instruments, Великобритания).

Для отмывания от ПАВ лиофилизированные образцы НЧ (из объема 1 мл) ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды. Суспензию перемешивали на встряхивателе Vortex (VWR Int., Германия) в течение 1 мин и отделяли НЧ центрифугированием на центрифуге AvantiJ-30 I (Beckman Coulter, США; 30 мин, 48384g, 4 – 8 °С). Супернатант удаляли, а осадок наночастиц использовали для сорбции нсРЭЧ.

Сорбцию нсРЭЧ осуществляли следующим образом: к 10 мг лиофильно высушенных НЧ или к отмы-



**Рис. 2.** Влияние препаратов нсРЭЧ на выживаемость крыс в условиях интрацеребральной посттравматической гематомы. 1 – Контроль ЛО ( $N = 10$ ); 2 – Контроль ИПГ ( $N = 20$ ); 3 – нсРЭЧ 0,05 мг/кг в/в ( $N = 19$ ); 4 – нсРЭЧ на PLLGA НЧ 0,05 мг/кг в/в ( $N = 18$ ). # — достоверность отличий от ЛО, при  $p < 0,05$  (точный критерий Фишера); \* — достоверность отличий от группы крыс с ИПГ, при  $p < 0,05$  (точный критерий Фишера).

тым НЧ прибавляли 1 мл раствора нсРЭЧ (0,60 мг/мл), НЧ ресуспендировали и перемешивали на магнитной мешалке (250 об/мин) при комнатной температуре. Время инкубации составляло 1 ч.

Определение степени сорбции нсРЭЧ наночастицами проводили методом УФ-спектрофотометрии по предварительно построенному калибровочному графику ( $\lambda_{\max} = 280$  нм). Суспензию НЧ, проинкубированных с нсРЭЧ, переносили в центрифужную пробирку и отделяли НЧ от свободного нсРЭЧ центрифугированием (30 мин, 48384 g, 4 – 8 °С). Супернатант отделяли и в нем спектрофотометрически определяли концентрацию свободного нсРЭЧ ( $C_{\text{св}}$ ). Параллельно проводили холостой опыт с супернатантом НЧ, ресуспендированных в воде без добавления нсРЭЧ. Степень сорбции ( $\alpha$ ) рассчитывали по формуле:

$$\alpha(\%) = ((C_{\text{исх}} - C_{\text{св}})/C_{\text{исх}}) \cdot 100 \%,$$

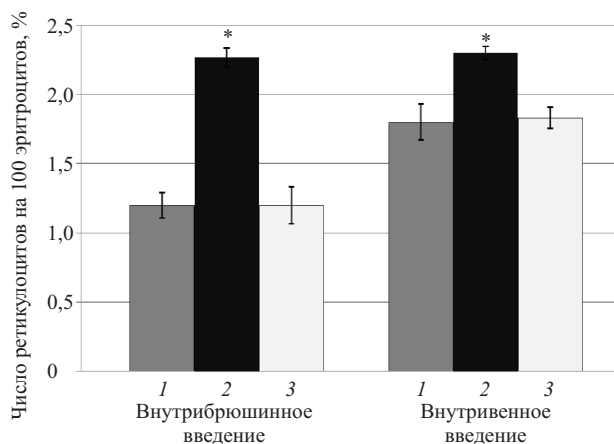
где  $C_{\text{исх}}$  — исходная концентрация нсРЭЧ, взятая для сорбции,  $C_{\text{св}}$  — концентрация свободного, не связанного с НЧ нсРЭЧ.

**Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ).** В биологических экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов массой 200 – 220 г. Животных содержали

#### Физико-химическая характеристика НЧ и эффективность сорбции нсРЭЧ на НЧ

Полимер	ПАВ	Средний размер, нм	$\zeta$ -потенциал, мВ	Полидисперсность	Степень сорбции, %
PLA ( $\eta^* = 0,34$ дл/г)	ПВБ 0,5 %	191,9 ± 0,9	-18,9 ± 2,05	0,103 ± 0,02	25,67 ± 2,6
PLA ( $\eta = 0,68$ дл/г)	ПВБ 0,5 %	203,3 ± 1,2	-23,8 ± 2,34	0,086 ± 0,02	23,4 ± 2,0
Resomer 502H	ПВБ 1 %	140,9 ± 0,47	-5,04 ± 0,220	0,101 ± 0,01	69,4 ± 1,2
Resomer 502H	ЧСА 1 %	90,09 ± 0,46	-30,1 ± 1,56	0,216 ± 0,01	81,07 ± 8,1
Resomer 752H	ЧСА 1 %	93,42 ± 0,73	-24,4 ± 2,30	0,196 ± 0,01	60,18 ± 6,0

\*  $\eta$  — истинная вязкость полимера.



**Рис. 3.** Результат подсчета количества ретикулоцитов у крыс после в/б и в/в введения препаратов эритропоэтина. \* — достоверность отличий от контрольной группы при  $p \leq 0,01$  (критерий Стьюдента). 1 – нсРЭЧ на ПЛГК НЧ (0,05 мг/кг); 2 – Эральфон, 5000 ЕД/кг; 3 – Физиологический раствор.

в специальном помещении при свободном доступе к пище и воде и естественном световом режиме.

Изучение противоинсультных, нейропротективных свойств соединений проводили на известной модели локального кровоизлияния в головном мозге — ИПГ [14, 15]. Локальное кровоизлияние в мозг (аутогеморрагический левополушарный инсульт) моделировали в области внутренней капсулы (*capsule interna*, координаты  $H = 5$  мм,  $L = 3,5$  мм,  $A = 2$  мм от брегмы). Животных наркотизировали хлоралгидратом в дозе 400 мг/кг. Ложно оперированным (ЛО) животным проводили скальпирование и трепанацию черепа.

В эксперименте использовали наносомальную форму нсРЭЧ на основе НЧ из ПЛГК (Resomer 502Н), стабилизированных 1 % ЧСА. В качестве препаратов сравнения использовали нативный нсРЭЧ (ООО “Протеиновый контур”, Россия). НсРЭЧ и его наносомальная форма вводились внутривенно (в/в) в дозе 0,05 мг/кг; перед введением препарат НЧ разводили в 1 % растворе Pluronic F68. Первое введение веществ осуществляли через 3,0 – 3,5 ч после операции и пробуждения животного от наркоза. Повторное ежедневное применение веществ проводили на второй и третий дни после операции. ЛО и контрольным крысам с геморрагическим инсультом вводили по той же схеме физиологический раствор. Динамику развития ИПГ исследовали на 1-е, 3-и и 7-е сут с регистрацией гибели крыс.

**Исследование влияния различных форм эритропоэтина на кроветворение.** При определении влияния наносомальной формы эритропоэтина на кроветворение использовали стандартную микроскопическую методику подсчета числа ретикулоцитов [16]. В качестве препарата сравнения использовали Эральфон® (ЗАО “ФармФирма “Сотекс”, Россия). В исследовании использовали 6 групп животных ( $N = 6$ ), препараты (нсРЭЧ на ПЛГК НЧ с 1 % ЧСА 0,05 мг/кг; Эральфон 5000 МЕ/кг) и 0,9 % физиологический раствор вводили внутрибрюшинно (в/б) или в хвостовую

вену (в/в) в течение 3 дней. Через 48 ч после последнего введения (время, через которое достигается наибольшее количество ретикулоцитов в крови) у крыс забирали кровь из хвостовой вены и готовили окрашенные бриллиантовым крезильным синим мазки для микроскопического исследования.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 11 с использованием критерия Стьюдента и точного критерия Фишера.

### Результаты и их обсуждение

Как известно из литературных данных, эффективность сорбции лекарственных веществ на полимерных НЧ зависит от целого ряда факторов, определяющих сродство этих соединений к поверхности НЧ [17]. В частности, важную роль играет электростатическое взаимодействие между сорбируемым соединением и поверхностью. Именно это взаимодействие может быть ключевым в случае нсРЭЧ, обладающего выраженными кислотными свойствами, что обусловлено наличием сиаловых кислот в терминальных положениях углеводных цепей. Кроме того, стабилизировать связывание целевых молекул с поверхностью НЧ могут и гидрофобные взаимодействия молекул нсРЭЧ с гидрофобной поверхностью НЧ. Для изучения возможности сорбции нсРЭЧ были синтезированы НЧ на основе различных полимеров — ПЛК и ПЛГК, различающихся по молекулярной массе и составу полимерной цепи. Для стабилизации НЧ использовали поливиниловый спирт (ПВС) или ЧСА. Физико-химические параметры НЧ, а также степень сорбции нсРЭЧ представлены в таблице. Полученные данные не позволяют выявить прямой связи между эффективностью сорбции нсРЭЧ и поверхностным зарядом НЧ. Однако из данных, представленных на рис. 1, прослеживается очевидная тенденция зависимости эффективности сорбции нсРЭЧ от структуры выбранного полимера и типа стабилизатора. Так, если предварительное отделение НЧ от ПВС позволило существенно повысить эффективность сорбции на них нсРЭЧ, то отмывка от НЧ ЧСА существенно понижала ее.

Изучение динамики выживания крыс показало, что к 7 дню наблюдения все ЛО крысы выжили, а в группе крыс с ИПГ выжило только 40 % животных (рис. 2). На фоне повторного 3-дневного введения нсРЭЧ, включенного в ПЛГК НЧ, к концу эксперимента выжило 77,8 % крыс, что на 40 % больше, чем в контрольной группе с ИПГ. Нативный нсРЭЧ практически не влиял на выживаемость крыс с ИПГ (рис. 2), что косвенно может указывать на недостаточность дозы введенного препарата нсРЭЧ для создания терапевтической концентрации в мозге и оказания нейропротекторного действия.

Как известно из литературных данных, нсРЭЧ практически не оказывает влияния на кроветворение из-за короткого периода полувыведения из плазмы [18]. Можно полагать, что НЧ могут некоторым образом стабилизировать молекулу нсРЭЧ, способствуя

повышению влияния на кроветворение, и соответственно повышению тромбообразования, что является фактором риска в терапии инсультов. Однако, как показал подсчет числа ретикулоцитов в крови (рис. 3), РЭЧ (препарат Эральфон<sup>®</sup>, использующийся для коррекции анемий) увеличивает гемопоэз при в/в и в/б введении в дозе 5000 МЕ, тогда как наносомальный эритропоэтин в эквивалентной дозе не оказывает достоверного увеличения числа молодых кровяных клеток у крыс по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор.

Коллектив авторов выражает благодарность ЗАО «ФармФирма «Сотекс» за помощь и финансирование исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. M. Brines, N. S. Patel, P. Villa, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10925 – 10930 (2008).
2. Q. Fan, K. K. Leuther, C. P. Holmes, et al., *Exp. Hematol.*, **34**, 1303 – 1311 (2006).
3. N. C. Wrighton, F. X. Farrel, R. Chang, et al., *Science*, **273**, 458 – 4641 (1996).
4. С. Э. Гельперина, В. И. Швец, *Биотехнология*, **3**, 8 – 23 (2009).
5. D. R. Calaria, G. Sharma, V. Beniwal, et al., *Pharm. Res.*, **26**, 492 – 501 (2009).
6. X. Gao, B. Wu, Q. Zhang, et al., *J. Control. Rel.*, **121**, 156 – 167 (2007).
7. K. B. Kurachmaeva, I. A. Djindjikhshvili, V. E. Petrovetal., *J. Drugtarget.*, **17**, 564 – 574 (2009).
8. S. Wagner, J. Kufleitner, A. Zensi, et al., *PLoS One*, **5** (2010).
9. S. Wohlfart, S. Gelperina & J. Kreuter, *J. Control. Rel.*, **161**, 264 – 273 (2012).
10. В. Ю. Балабаньян, И. Н. Солев, О. С. Елизарова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **74**(10), 12 – 15 (2011).
11. X. Rong, X. Mo, T. Ren, et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **42**, 334 – 342 (2011).
12. J. He, M. Feng, X. Zhou, et al., *Int. J. Pharm.*, **416**, 69 – 76 (2011).
13. M. Ueda, J. Kreuter, *Microencapsulation*, **14**(5), 593 – 605 (1997).
14. Т. Л. Гарибова, И. П. Галаева, Т. А. Воронина и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(2), 45 – 48 (2003).
15. А. Н. Макаренко, Н. С. Косицин, С. В. Карпенко, В. А. Мишина, А. с. № 1767518 (1990).
16. С. И. Гуляева, М. Ю. Мещерякова, К. В. Демеш, *Большой практикум по гематологии*, Издательско-полиграфический центр ВГУ, Воронеж (2009), сс. 10 – 11.
17. D. T. Birnbaum, J. D. Kosmala, and L. Brannon-Peppas, *J. Nanoparticle Res.*, **2**(2), 173 – 181 (2000).
18. M. Etcheverrigaray, N. Ceaglio, M. Mattio, et al., *BMC Proceedings*, **5**(8), 3 (2011).

Поступила 09.07.12

## EFFICIENCY OF NEW COLLOIDAL FORM OF LOW-SIALYLATED POLYLACTIDE BASED ERYTHROPOIETIN WITH RESPECT TO EXPERIMENTAL HEMORRHAGIC STROKE IN RATS

O. S. Elizarova<sup>1</sup>, V. Yu. Balaban'yan<sup>2</sup>, E. V. Shipulo<sup>3</sup>, O. O. Maksimenko<sup>3</sup>, L. V. Vanchugova<sup>3</sup>, S. A. Litvinova<sup>1</sup>, T. L. Garibova<sup>1</sup>, T. A. Voronina<sup>1</sup>, and S. E. Gel'perina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Zakusov State Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125315 Russia;

<sup>2</sup> Drug Technology Co., Moscow, Russia;

<sup>3</sup> Nanosystem R&D Inc., Moscow, Russia

This study was aimed at developing a method for obtaining a nanosomal colloidal form of low-sialylated human erythropoietin (lsHEP) possessing neurotropic (antihemorrhage) activity. Parameters of HEP adsorption on nanoparticles of (i) homopolymer of lactic acid and (ii) copolymer of lactic and glycolic acids, average sizes of these nanoparticles, and aggregation stability of obtained complexes have been determined. The most effective adsorption (>80%) was achieved for a 50/50 copolymer of lactic and glycolic acids. Experiments on rats with intracerebral post-traumatic hematoma model showed that the obtained nanosomal lsHEP exhibited a significant neuroprotective effect, which was manifested by 40% reduced loss of test animals (77.8% survival). Chronic administration of nanosomal lsHEP did not influence hemopoiesis in the experimental animals.

**Key words:** Nanoparticles, copolymer of lactic and glycolic acids, erythropoietin, neuroprotection, intracerebral post-traumatic hematoma, hematocrit