

На правах рукописи



Бейгуленко Дмитрий Владимирович

**СИНТЕЗ КОНЬЮГАТОВ ПАКЛИТАКСЕЛА С БИОТИНОМ И
ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ САМОСОБИРАЮЩИХСЯ
НАНОСТРУКТУР НА ИХ ОСНОВЕ**

1.4.16. – Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Москва 2026

Работа выполнена в научно-образовательной лаборатории Систем доставки лекарственных веществ (НОЛ СДЛВ) Факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета имени Д. И. Менделеева (ФГБОУ ВО РХТУ им. Д. И. Менделеева).

Научный руководитель: **Кочетков Константин Александрович**
доктор химических наук, профессор,
заведующий лабораторией гомолитических реакций
элементоорганических соединений
ФГБУН Института элементоорганических соединений
имени А.Н. Несмеянова Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Белоглазкина Елена Кимовна**
доктор химических наук, доцент,
профессор Химического факультета ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

Золотцев Владимир Александрович
кандидат химических наук, старший научный
сотрудник, заведующий лабораторией
синтеза физиологически активных соединений ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Ведущая организация: ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»

Защита состоится 09 июня 2026 г. в 15.00 на заседании диссертационного совета 24.1.108.03 при ФГБУН Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д.1, зал заседаний Ученого совета.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФИЦ ПХФ и МХ РАН <https://icp-ras.ru/>. Текст автореферата размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу <https://vak.gisnauka.ru/>.

Автореферат разослан _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.108.03
кандидат биологических наук



Л.В. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В современной медицинской химии одними из приоритетных задач являются разработка и усовершенствование лекарственных веществ (ЛВ), предназначенных для борьбы с онкологическими заболеваниями. Так, паклитаксел (РТХ), являющийся ингибитором митоза и нашедший широкое применение в качестве химиотерапевтического агента, обладает высокой клинической эффективностью, однако его практическое применение ограничено токсическими эффектами (нейтропения, артралгия, мукозит, гепатотоксичность и др.) вследствие недостаточной избирательности по отношению к опухолевым клеткам. Он также обладает низкой растворимостью в водных средах, поэтому с целью её повышения в состав существующих коммерческих форм РТХ и других таксанов вводят органические растворители и солюбилизаторы, которые способны вызывать нежелательные побочные эффекты, например, аллергические реакции. Конъюгация РТХ с гидрофильной молекулой, принимающей участие в метаболических процессах опухолевых клеток, может повысить селективность его действия. Биотин, являющийся водорастворимым витамином (В₇/Н), принимает участие в глюконеогенезе, метаболизме аминокислот и биосинтезе жирных кислот, в связи с чем быстро пролиферирующие опухолевые клетки испытывают острую потребность в данном соединении. Как следствие, системы транспорта биотина гиперэкспрессированы в ряде опухолей человека (аденокарцинома молочной железы, лёгкого, толстой кишки, карцинома печени, шейки матки, яичников и др.). Эти особенности позволяют рассматривать биотин в качестве избирательного вектора, способного повысить селективность доставки РТХ в клетки злокачественных новообразований и, тем самым, привести к его более рациональному использованию в качестве химиотерапевтического агента. Помимо активного нацеливания на опухоль присоединение биотина к паклитакселу будет способствовать тому, что его конъюгат будет обладать способностью образовывать в воде самособирающиеся наночастицы (НЧ), что является перспективной лекарственной формой, потенциально лишённой необходимости применения в её составе различных солюбилизаторов и органических растворителей. Кроме того, наночастицы могут пассивно накапливаться в тканях злокачественного новообразования за счёт эффекта повышенной проницаемости и

удерживания (*англ.* enhanced permeability and retention, EPR), что дополнительно повышает шансы попадания терапевтического агента непосредственно в опухоль.

Степень разработанности темы. В мировой литературе описан подход к созданию адресных систем доставки ЛВ, предусматривающий их прямое присоединение к биотину. Получаемые таким образом конъюгаты способны эффективно накапливаться в опухолевых клетках, высвободить активное начало и, тем самым, приводить к их гибели. В частности, существуют примеры конъюгатов биотина с таксанами, представленные в литературе (Рисунок 1). Одним из недавних соединений данного типа является биотинилированное производное доцетаксела, которое продемонстрировало высокую противоопухолевую активность в исследованиях *in vivo* по сравнению с исходным таксаном [1]. Также описан конъюгат паклитаксела с биотином, содержащий линейный пептидный линкер [2]. Это соединение показало свою эффективность в стабилизации микротрубочек *in vitro*. Кроме того, известен ряд биотинилированных производных таксоида второго поколения SB-T-1214, содержащих редокс-чувствительный линкер и способных высвободить ЛВ в восстановительной среде цитозоля опухолевой клетки [3, 4]. Таким образом, конъюгаты таксанов и биотина обладают высоким потенциалом как перспективные химиотерапевтические средства. Тем не менее, авторами представленных работ [1–4] так и не была решена проблема малой растворимости таксанов и их конъюгатов с биотином. Однако даже если бы растворимость конъюгатов оказывалась высокой в водных средах, данные соединения могли бы выводиться через почки или аккумулироваться в печени, где происходит метаболизм биотина, а также подвергаться деградации в кровотоке. Более того, невозможным оказывалось бы пассивное накопление в опухоли таких конъюгатов за счёт EPR-эффекта. В связи с этим, перспективным выглядит создание стабильных самособирающихся коллоидных частиц на основе конъюгатов паклитаксела с биотином. Подобные наноструктуры, лишённые полимерного носителя, целиком будут представлены пролекарством химиотерапевтического агента. Такие НЧ были бы

¹ Rayan M. et al. A novel docetaxel-biotin chemical conjugate for prostate cancer treatment // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27, no. 3. – 961, <https://doi.org/10.3390/molecules27030961>.

² Lis L. G. et al. Synthesis and biological evaluation of a biotinylated paclitaxel with an extra-long chain spacer arm // *ACS Medicinal chemistry letters*. – 2012. – Vol. 3, no. 9. – P. 745-748, <https://doi.org/10.1021/ml300149z>.

³ Chen S. et al. Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release // *Bioconjugate chemistry*. – 2010. – Vol. 21, no. 5. – P. 979-987, <https://doi.org/10.1021/bc9005656>.

⁴ Vineberg J. G. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of theranostic vitamin-linker-Taxoid conjugates // *Journal of medicinal chemistry*. – 2015. – Vol. 58, no. 5. – P. 2406-2416, <https://doi.org/10.1021/jm5019115>.

достаточно просты в получении, могли бы предохранять ЛВ от деградации и избирательно попадать в опухоль как за счёт пассивного, так и активного нацеливания.

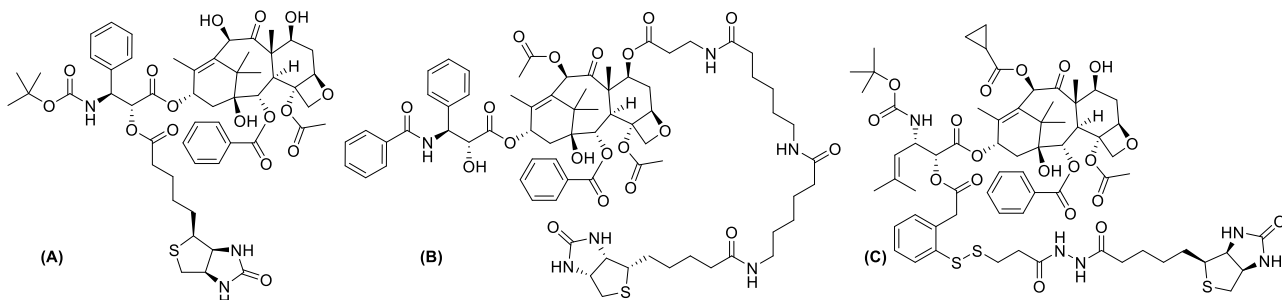


Рисунок 1 – Примеры ранее описанных конъюгатов биотина с доцетакселом (А), паклитакселом (В) и таксоидом второго поколения SB-T-1214 (С).

Цель исследования заключается в создании таргетированной системы доставки паклитаксела на основе коллоидно-стабильных наночастиц его конъюгата с биотином. Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Синтез новых конъюгатов паклитаксела с биотином, отличающихся длиной и типом линкера.
2. Выявление принципиальной способности конъюгатов паклитаксела с биотином формировать самособирающиеся наночастицы.
3. Оптимизация условий получения НЧ на основе конъюгата и оценка перспективности разработанного прототипа лекарственной формы.
4. Установление влияния природы линкера в составе конъюгатов на их возможность самоорганизации в водной среде, а также на ключевые характеристики получаемых на их основе НЧ.
5. Синтез конъюгата со стимул-чувствительным линкером, а также получение наночастиц на его основе.
6. Выбор наиболее перспективного типа конъюгата паклитаксела с биотином и сравнение с коммерческой лекарственной формой паклитаксела.

Научная новизна. Несмотря на активное развитие подходов к направленной доставке ЛВ, современные пути увеличения растворимости и селективности таксанов (в частности, паклитаксела), основанные на включении в состав наноразмерных полимерных (или иных) носителей и синтезе конъюгатов с макромолекулами (антитела, пептиды, аптамеры) имеют ряд недостатков, связанных с ограниченной биодоступностью, высокой стоимостью и сложностью производства,

иммуногенностью (для антител) и ограниченной стабильностью в крови (макромолекулы могут подвергаться деградации в кровотоке). По сравнению с получением макромолекулярных конъюгатов и полимерных НЧ, путь образования конъюгатов с биотином представляется более простой и экономически выгодной стратегией, сочетающей эффективную доставку через активно экспрессируемые в опухолевых клетках транспортёры биотина с потенциально низкой токсичностью, благодаря избирательному накоплению в опухоли вместе с отсутствием потенциальной ассоциированной с материалом-носителем токсичности. В рамках настоящего исследования были получены новые конъюгаты паклитаксела с биотином и продемонстрирована их принципиальная способность формировать самособирающиеся наночастицы. Впервые были получены коллоидно-стабильные наноразмерные структуры, образованные конъюгатами паклитаксела с биотином и оптимизирован способ их получения. Была впервые получена серия конъюгатов паклитаксела с биотином, различающихся длиной используемого линкера, исследована их способность формировать коллоидные структуры и свойства. Поскольку внедрение гидрофобного аминокислотного линкера не помешало конъюгатам образовывать НЧ в воде, то в дальнейшем впервые синтезирован конъюгат, содержащий тиоэфирный линкер, потенциально способный расщепляться под действием активных форм кислорода (АФК) и высвобождать РТХ внутри опухолевой клетки. В итоге разработан прототип лекарственной формы (ЛФ) на основе представленного гибридного соединения.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в рамках исследования результаты обеспечат дальнейшее развитие систем адресной доставки ЛВ с использованием низкомолекулярных векторов для повышения эффективности химиотерапии и снижения побочных эффектов её применения. Разработанные в настоящей работе НЧ конъюгатов при сравнительной простоте получения могут послужить основой для дальнейшего создания новых лекарственных форм для химиотерапии онкологических заболеваний. Такие конъюгаты, ввиду своей потенциальной способности избирательно накапливаться в опухолях, клетки которых гиперэкспрессируют системы транспорта биотина, выделяются высокой избирательностью действия.

Методология и методы исследования. В диссертационном исследовании были использованы современные методы тонкого органического синтеза, большая часть из которых нацелена на формирование амидных и сложноэфирных связей. При очистке растворителей и выделении промежуточных и конечных веществ были использованы классические методы, а именно перегонка при атмосферном и пониженном давлениях, экстракция, перекристаллизация, тритурация и нормально-фазовая колоночная хроматография (КХ). Аутентичность полученных соединений была подтверждена одномерной и двумерной гомо- и гетероядерной спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрией высокого разрешения (МСВР) с ионизацией электрораспылением (ИЭР), спектроскопией в инфракрасной (ИК) области, а также высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографией. Наночастицы были получены способом наноосаждения, суть которого заключается в их образовании при медленном прибавлении раствора конъюгата в органическом растворителе, смешивающемся с водой, в водный раствор стабилизатора, предотвращающего агрегацию коллоидных структур. Для установления характеристик наноразмерных структур использованы следующие современные методы: динамическое лазерное светорассеяние (ДЛС) — определение гидродинамического диаметра и индекса полидисперсности (*англ.* polydispersity index, PDI) НЧ, электрофоретическое рассеивание света (ЭРС) — определение поверхностного ζ -потенциала НЧ, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) — анализ морфологии наноразмерных структур, авидин-биотиновый (ГАБК-авидиновый, т.к. здесь применяется краситель 4'-гидроксиазобензол-2-карбоновая кислота (ГАБК)) — определение содержания доступного для взаимодействия с транспортёрами на поверхности клеток биотина в составе НЧ, спектрофотометрия — анализ содержания стабилизатора в составе лиофилизата НЧ. Для определения гемолитической активности наночастиц использован фотометрический тест, основанный на регистрации окисленных форм гемоглобина (гемихромов). Цитотоксическая активность НЧ конъюгатов (IC_{50}) оценена с помощью стандартного колориметрического МТТ теста.

Положения, выносимые на защиту.

1. Синтез новых конъюгатов паклитаксела с биотином.
2. Установление принципиальной способности конъюгатов формировать в водных средах самособирающиеся наночастицы.

3. Оценка приемлемости включения в состав конъюгатов гидрофильных и гидрофобных линкеров.
4. Получение конъюгата паклитаксела с биотином со стимул-чувствительным тиоэфирным линкером.
5. Разработка и оценка возможности внутривенного введения прототипа инъекционной лекарственной формы на основе наночастиц конъюгата, содержащего стимул-чувствительный линкер.
6. Сравнение цитотоксичности разработанного прототипа лекарственной формы и известного коммерческого препарата на основе паклитаксела.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов достигнута применением современных физико-химических методов анализа как соединений, так и коллоидных структур, полученных на их основе. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего значения со среднеквадратическим отклонением (число повторений не менее трёх). Материалы диссертационной работы опубликованы в российских и иностранных научных журналах и представлены на XXX и XXXII Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023» и «Ломоносов-2025» (МГУ им. М. В. Ломоносова), а также на III, IV и V Школах молодых учёных с международным участием «Химия и технология биологически активных веществ для медицины и фармации» (РХТУ им. Д. И. Менделеева). Работа была непосредственно связана с выполнением грантов РФ (№ 25-73-00018 и № 23-25-00194) и государственного задания, финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ (проекты FSSM-2025-0002 и FSSM-2022-0003).

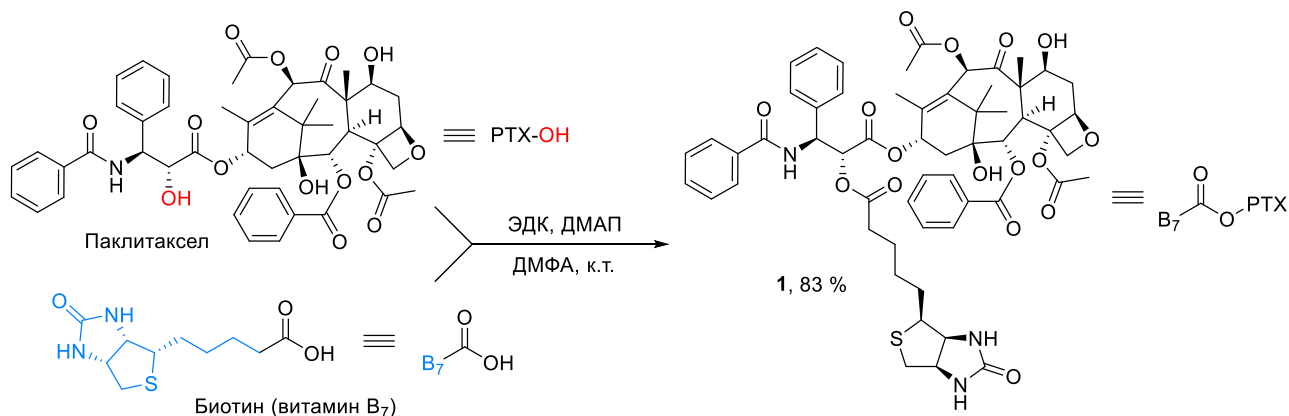
Личный вклад автора состоит в разработке концепции диссертационного исследования, поиске и анализе литературы по тематике работы, разработке и осуществлении схем синтеза целевых соединений, пробоподготовке и интерпретации спектров ЯМР, МСВР (ИЭР), регистрации и анализе ИК спектров, анализе хроматограмм, полученных методами ВЭЖХ и ТСХ, получении коллоидных структур и определении их характеристик с помощью ДЛС, ЭРС, ГАБК-авидинового теста и спектрофотометрии.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Выявление принципиальной способности конъюгатов паклитаксела с биотином формировать самособирающиеся наночастицы.

Для оценки принципиальной способности конъюгатов формировать в воде наночастицы первоначально было рассмотрено два подхода к получению гибридных соединений. Первый основан на прямой конъюгации биотина с паклитакселом с помощью образования сложноэфирной связи. Второй — на соединении двух молекул через гидрофильный линкер, который, как предполагалось, может облегчить формирование НЧ в водной среде за счёт улучшения амфифильности. Первый конъюгат без линкера получали путём этерификации паклитаксела биотином по Штеглиху в присутствии гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (ЭДК) и 4-диметиламинопиридина (ДМАП) в качестве катализатора в сухом N,N-диметилформамиде (ДМФА) при комнатной температуре (Схема 1), что после очистки колоночной хроматографией приводило к соединению **1**.

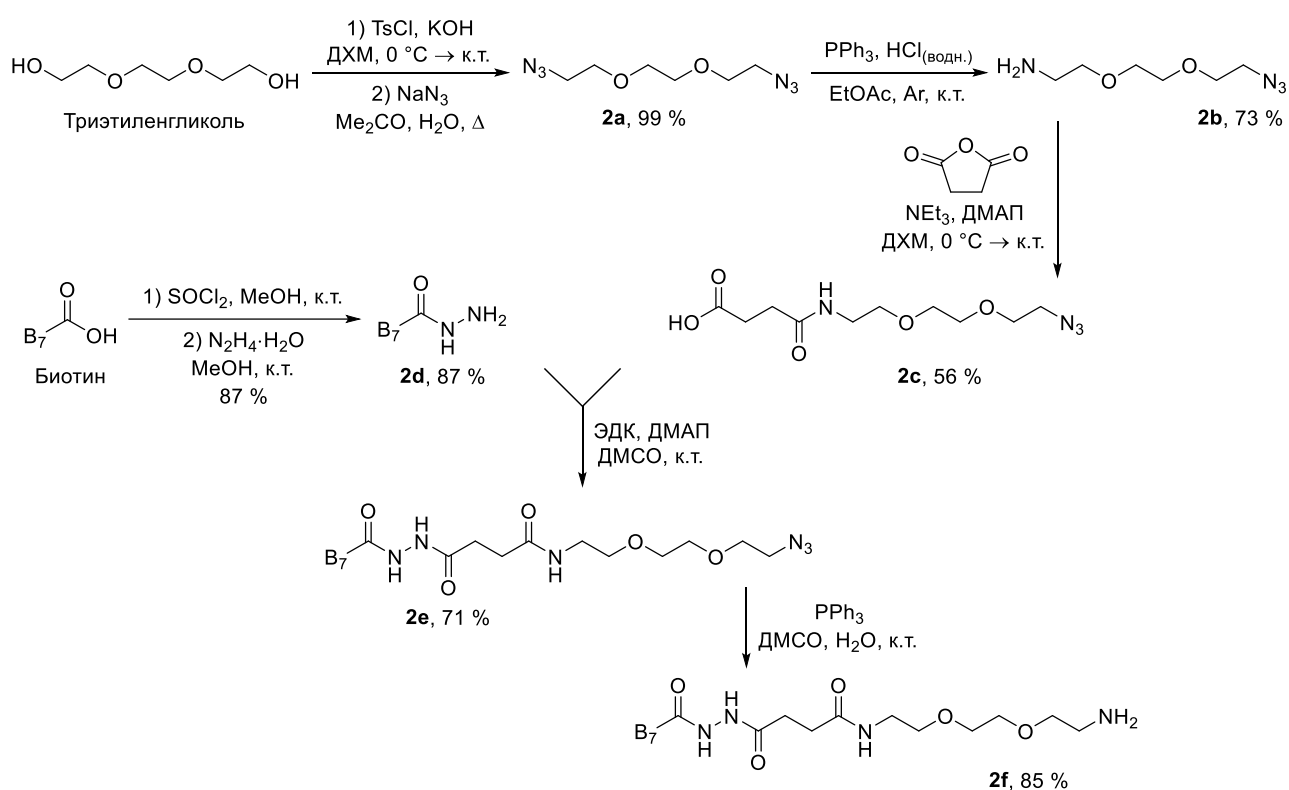
Схема 1



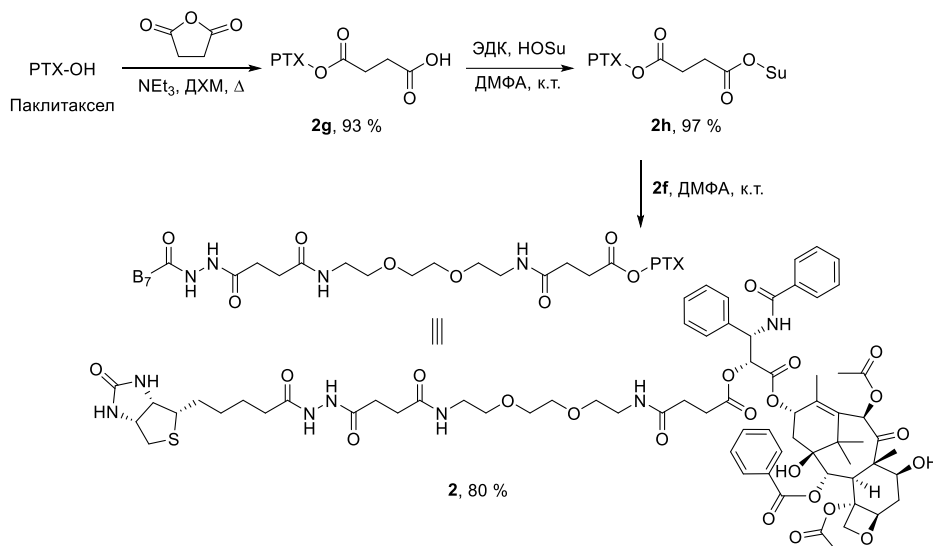
В качестве структурных элементов гидрофильного линкера второго конъюгата были выбраны триэтиленгликоль и янтарная кислота, нашедшие широкое применение в создании систем адресной доставки и различных гибридных соединений (Схема 2). Синтез начинали с тозилрования триэтиленгликоля в присутствии гидроксида калия в дихлорметане (ДХМ). Промежуточный бис-тозилат далее использовали для алкилирования азид-ионов в смеси воды и ацетона, что позволяло получать вещество **2a**. Его далее в смеси соляной кислоты и этилацетата обрабатывали эквивалентным количеством трифенилфосфина под аргоном, что позволяло избирательно

восстанавливать одну из азидных групп. Полученное соединение **2b** ацилировали янтарным ангидридом в присутствии смеси оснований: триэтиламина и ДМАП, что приводило к интермедиату **2c**. Затем его в безводном диметилсульфоксиде (ДМСО) присоединяли карбодиимидным методом к гидразиду биотина **2d**, который в свою очередь был синтезирован путём последовательной этерификации биотина с последующим гидразинолизом сложного эфира. Затем концевую азидную группу соединения **2e** восстанавливали по реакции Штаудингера (с последующим гидролизом промежуточного иминофосфорана), что приводило к производному биотина **2f** с незащищённой аминогруппой.

Схема 2



Параллельно паклитаксел региоселективно ацилировали янтарным ангидридом, что приводило к гемисукцинату **2g**, карбоксильную группу которого далее переводили в активированный эфир обработкой ЭДК и N-гидроксисукцинимидом (Схема 3). Полученным соединением **2h** затем ацилировали производное биотина **2f**, что приводило к конъюгату **2**, содержащему гидрофильный линкер.



Для получения коллоидных структур был выбран способ наноосаждения, ввиду простоты и отсутствия необходимости использования дорогостоящего оборудования для гомогенизации. Для этого раствор соответствующего конъюгата (или паклитаксела) в этаноле при интенсивном перемешивании прибавляли по каплям к водному раствору стабилизатора, в качестве которого был выбран низкомолекулярный поливиниловый спирт (ПВС, 9-10 кДа), после чего суспензию перемешивали, затем упаривали от органического растворителя, фильтровали при необходимости и лиофилизировали. Данный полимер был выбран по нескольким причинам, главные из которых — это его биосовместимость, низкая гемолитическая активность, гипоаллергенность и способность выполнять функцию криопротектора при лиофильной сушке НЧ за счёт наличия большого числа гидроксильных групп. Установлено, что только конъюгат **1** в данных условиях был способен формировать коллоидно-стабильные наноструктуры с малым значением PDI. Суспензия НЧ данного соединения обладала лёгкой опалесценцией, в то время как суспензия коллоидных структур паклитаксела при той же концентрации была более мутной, что обусловлено большим среднеобъёмным диаметром (d_v) частиц в данном случае (Таблица 1). В то же время конъюгат **2** вопреки ожиданиям не формировал в воде НЧ при наноосаждении и вместо этого наблюдали образование гелеподобной массы.

Таблица 1 – Параметры коллоидных структур паклитаксела и конъюгатов **1** и **2**.

Коллоидные структуры вещества	Паклитаксел	Конъюгат 1	Конъюгат 2
d_v , нм	358 ± 94	127 ± 1	$409 \pm 96^*$
PDI	$0,506 \pm 0,380$	$0,098 \pm 0,009$	$0,617 \pm 0,157^*$

* – полная агрегация.

По данным ПЭМ (Рисунок 2) конъюгат **1** в водном растворе ПВС формирует сферические наночастицы. В то же время паклитаксел в тех же условиях образует достаточно крупные цилиндрические структуры, агрегирующие со временем. Было также установлено, что гель конъюгата **2** состоит из волокон в воде. Таким образом, введение гидрофильного линкера в состав конъюгата паклитаксела с биотином предотвращает способность гибридного соединения образовывать НЧ в водной среде. Как следствие конъюгат **1** оказался более подходящим для получения наноструктур. Для того, чтобы данный нанопрепарат мог выступать в качестве прототипа лекарственной формы, он должен иметь концентрацию ЛВ, сопоставимую с концентрациями в коммерчески доступных ЛФ, обладать коллоидной стабильностью, сохранять постоянные ключевые параметры при хранении и иметь низкую гемолитическую активность.

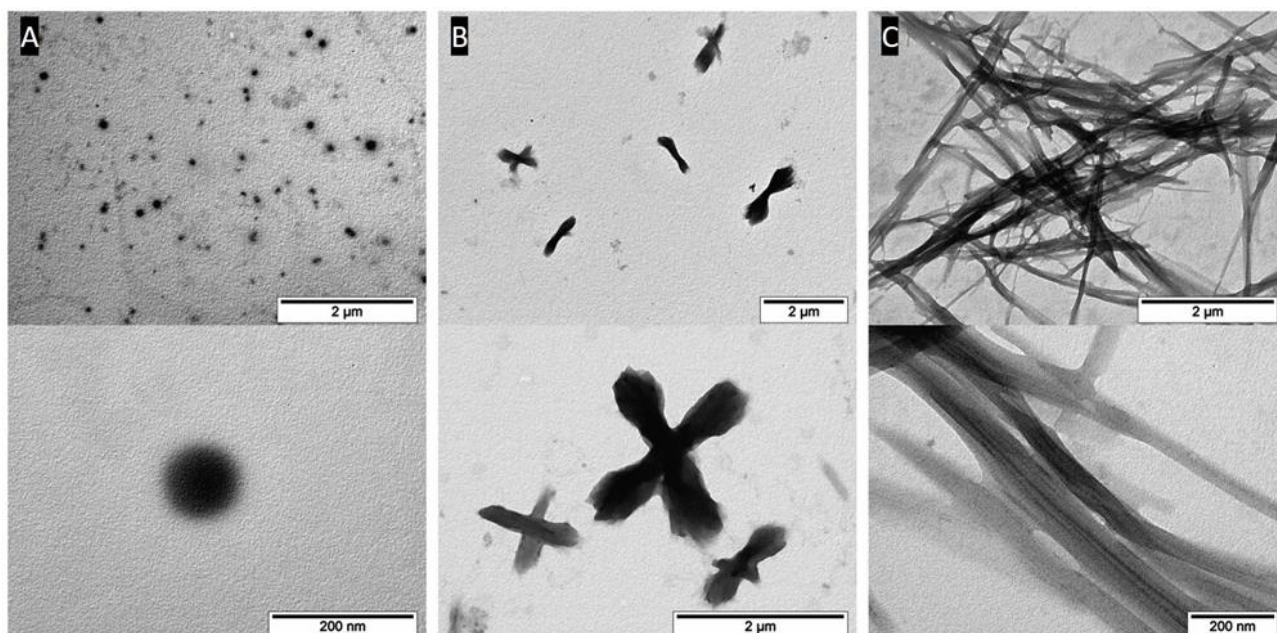


Рисунок 2 – Микрофотографии, полученные с помощью ПЭМ, коллоидных структур на основе конъюгата **1** (А), паклитаксела (В) и конъюгата **2** (С).

2. Оптимизация условий получения наночастиц на основе прямого конъюгата паклитаксела с биотином и оценка перспективности разработанного прототипа лекарственной формы.

Для оценки ключевых характеристик разрабатываемого прототипа ЛФ необходимо было первоначально оптимизировать процесс получения НЧ конъюгата **1**. Для этого сначала варьировали концентрацию данного соединения в конечной суспензии при различном содержании ПВС, и отслеживали, как меняются параметры

наноструктур (Рисунок 3А). Для того, чтобы им мог быть присущ EPR-эффект, а также воспроизводимость фармакокинетических и фармакодинамических параметров, следовало подобрать условия, при которых размер частиц оказывался бы меньше 200 нм, а PDI — не более 0,2. Установлено, что максимально допустимая концентрация конъюгата **1** в суспензии составляет 2 мг/мл, а оптимальное содержание ПВС в суспензии лежит в диапазоне от 0,2 до 1 % (м/о). Для уточнения концентрации стабилизатора была приготовлена серия суспензий НЧ с различным его содержанием. Найдено, что минимальные значения размера и PDI наноструктур наблюдались при концентрации ПВС 0,8 % (м/о) (Рисунок 3В).

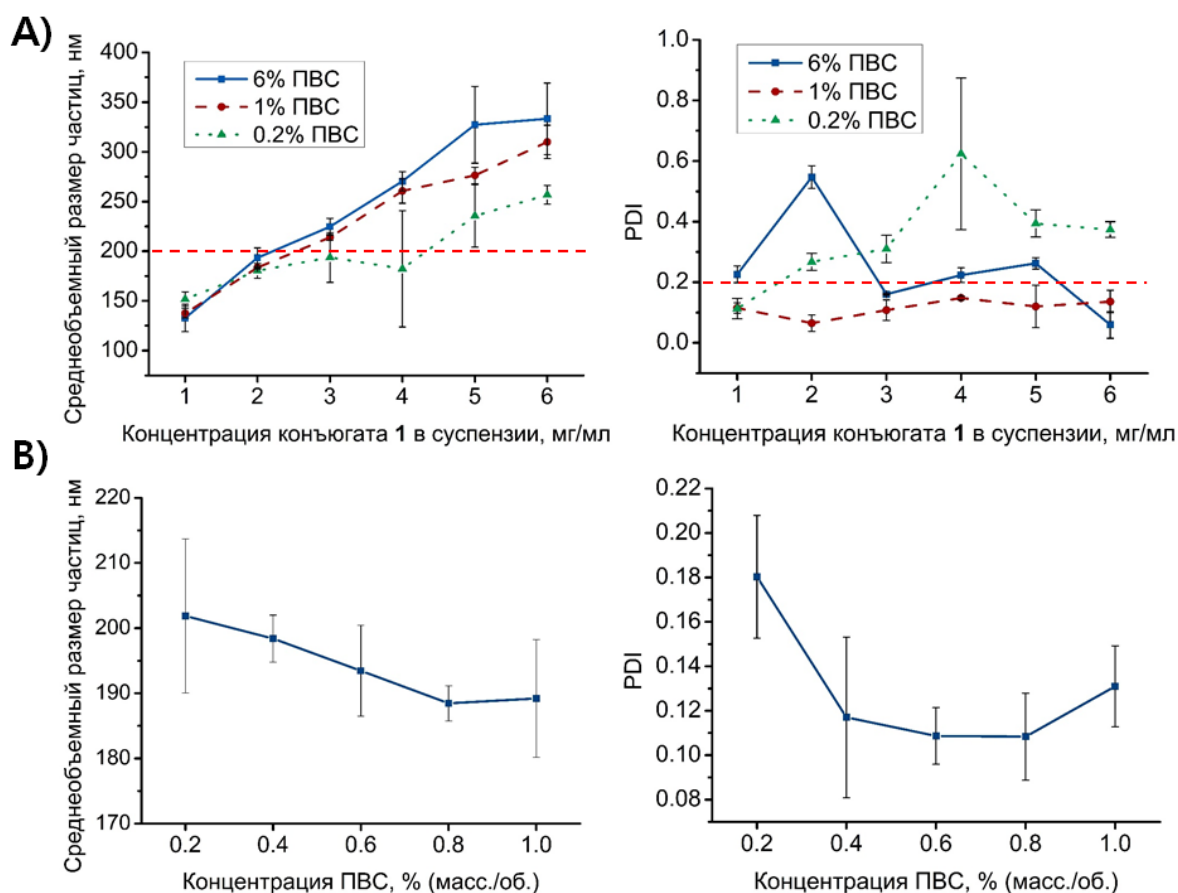


Рисунок 3 – Оптимизация процесса получения НЧ конъюгата **1** методом наносаждения (пояснения см. в тексте).

В оптимальных условиях были получены три серии НЧ конъюгата **1**. Во всех случаях наблюдалась воспроизводимость таких характеристик, как размер, PDI, эффективность инкапсуляции (отношение количества вещества, включившегося в НЧ, к общему его количеству, взятому для их получения) и содержание конъюгата, его примесей и ПВС во флаконе (Таблица 2). Стоит отметить, что почти весь биотин в составе наноструктур оказывался доступным для взаимодействия с модельным

рецептором, в качестве которого был выбран авидин — белок, известный своим сильным сродством к биотину. Это указывает на то, что наличие короткого линкера в структуре конъюгата, по-видимому, не препятствует его потенциальному взаимодействию с транспортными белками опухолевых клеток, ответственными за рецептор-опосредованный эндоцитоз. Кроме того, исследование морфологии НЧ с помощью ПЭМ (Рисунок 4) подтвердило образование сферических нанообъектов, окружённых отчётливой оболочкой из стабилизатора. По всей видимости, ПВС, благодаря наличию большого количества полярных гидроксильных групп в своей структуре, склонен к сорбции на поверхности НЧ в процессе их формирования. Однако нельзя исключать, что какие-то звенья полимера могли интегрироваться в состав наноструктур при их нуклеации.

Таблица 2 – Характеристика НЧ конъюгата 1, полученных в оптимальных условиях.

Параметр	Значение
Среднеобъёмный диаметр частиц, нм	212 ± 8
PDI	$0,064 \pm 0,019$
Содержание конъюгата, мг во флаконе	$0,86 \pm 0,03$
Содержание родственных примесей, %	$1,03 \pm 0,47$
Содержание ПВС, мг во флаконе	$3,97 \pm 0,05$
Эффективность инкапсуляции, %	79 ± 2
Доля доступного биотина, %	97 ± 3

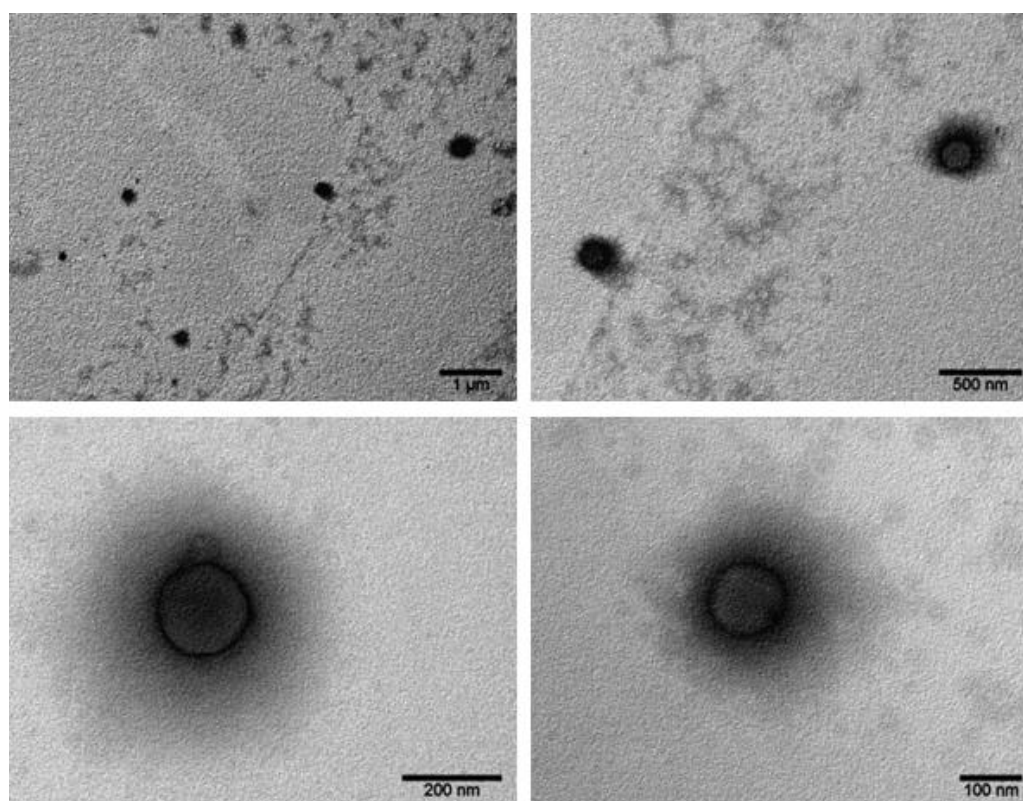


Рисунок 4 – Микрофотографии ПЭМ наночастиц конъюгата 1, полученные наноосаждением в оптимизированных условиях.

Наночастицы оказались достаточно стабильны в средах, содержащих белок и моделирующих культуральную среду и плазму крови (Рисунок 5), а именно в смесях фосфатно-солевого буфера (ФСБ, pH 7,4) и фетальной бычьей сыворотки (ФБС). При этом не наблюдалась их агрегация или разрушение.

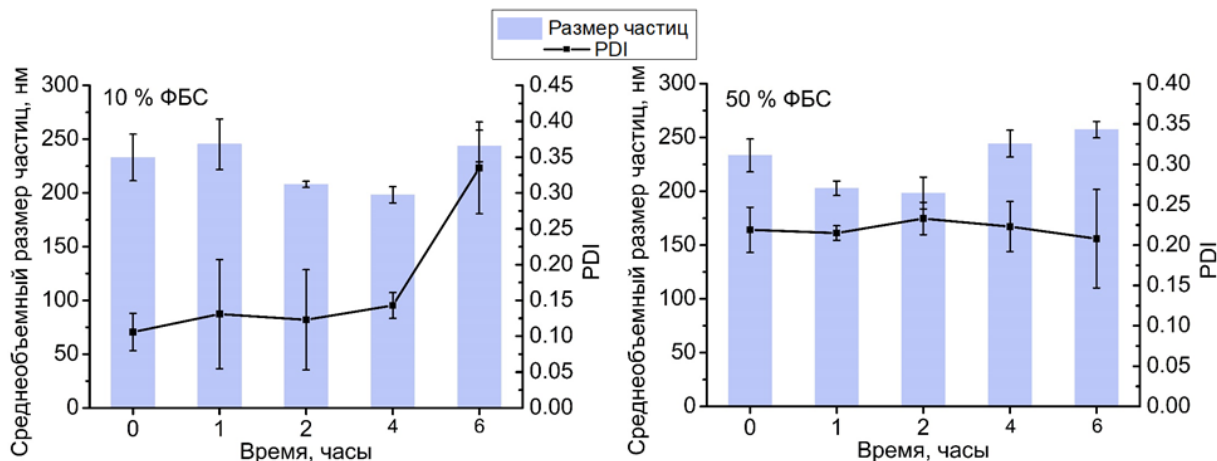


Рисунок 5 – Изучение коллоидной стабильности НЧ конъюгата **1** в средах, моделирующих культуральную среду (слева) и плазму крови (справа).

При циркуляции в кровотоке прототип лекарственной формы не должен разрушать эритроциты, то есть должен обладать низкой гемолитической активностью. В настоящем исследовании она была оценена для НЧ конъюгата **1** и для коммерческой ЛФ паклитаксела (Рисунок 6). Установлено, что при различных концентрациях препарата обе формы имели сопоставимые значения гемолитической активности, что указывает на возможность внутривенного введения полученных наноструктур.

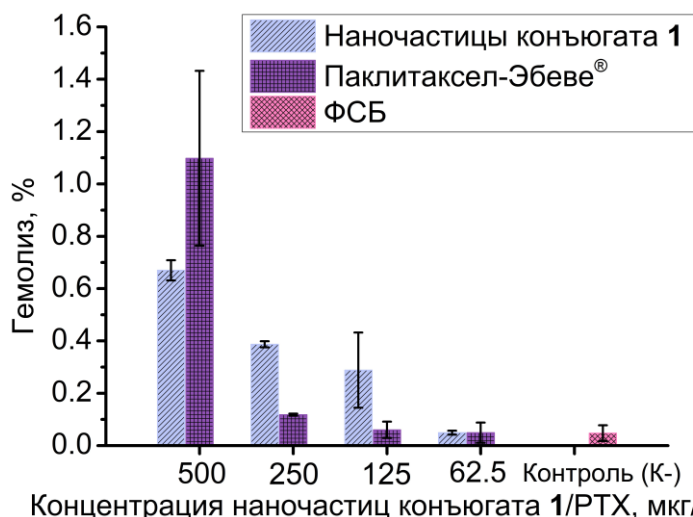


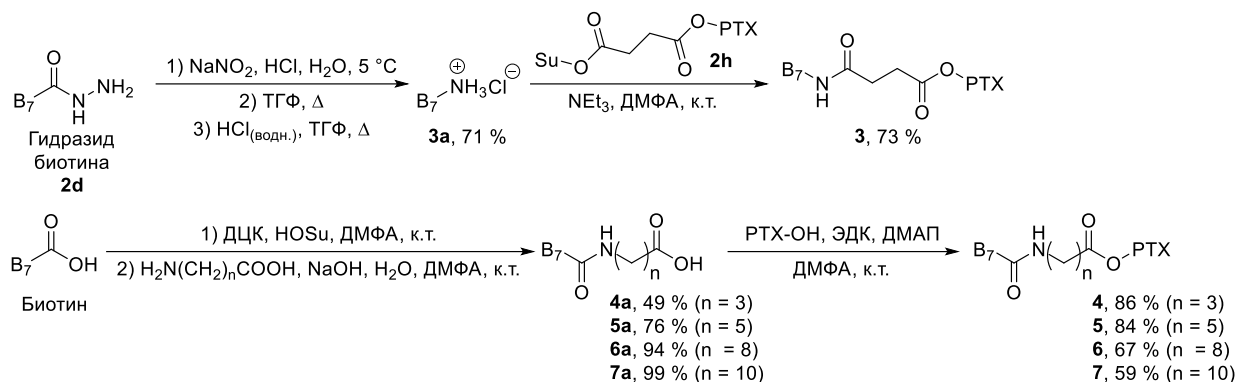
Рисунок 6 – Сравнительная гистограмма гемолитических активностей НЧ конъюгата **1** и коммерческой лекарственной формы РТХ (Паклитаксел-Эбеве®).

Однако, учитывая, что в конъюгате **1** биотин непосредственно присоединён к РТХ, возможность высвобождения химиотерапевтического агента из такого гибридного соединения оставалась неясной. Эту проблему можно было решить путём

включения в структуру конъюгата стимул-чувствительного линкера, представляющего собой группу, связывающую ЛВ с вектором, способную расщепляться под воздействием определенного фактора внутри опухолевой клетки и приводить к высвобождению химиотерапевтического агента. Однако, конъюгат, содержащий такой линкер, мог потерять способность к самоорганизации в наночастицы в водной среде подобно конъюгату **2**. Поэтому, прежде чем включать в состав гибридных молекул синтетически более сложные линкеры, содержащие стимул-чувствительные группы, необходимо было предварительно оценить влияние введения простых гидрофобных линкеров различной длины на возможность самоорганизации получаемых конъюгатов и характеристики соответствующих наноструктур. Если наличие даже короткого гидрофобного линкера не мешает гибриднему соединению формировать коллоидно-стабильные НЧ, то это даст возможность перейти к перспективным наноструктурам на основе конъюгатов, содержащих стимул-чувствительные линкеры.

3. Оценка возможности включения коротких гидрофобных линкеров в состав конъюгатов паклитаксела с биотином.

Для получения серии конъюгатов были предварительно синтезированы аминокислотные производные биотина (Схема 4). Исходным соединением для конъюгата с коротким линкером выступил гидразид биотина **2d**. Его боковая цепь была укорочена с помощью перегруппировки Курциуса. Для этого вещество **2d** нитрозировали в кислой среде, что сопровождалось образованием ацилазида, который после нагревания превращён в соответствующий изоцианат. Далее его гидролизировали раствором HCl, что приводило к гидрохлориду норбиотинамина **3a**, который затем в присутствии триэтиламина ацилировали производным паклитаксела **2h**, в результате чего был получен конъюгат **3**, содержащий короткий линкер. Для синтеза остальных конъюгатов предварительно в присутствии дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) получали N-гидроксисукцинимидный эфир биотина, которым далее ацилировали натриевые соли аминокислот, что позволило получить промежуточные соединения **4a–7a**. Затем проводили этерификацию паклитаксела аминокислотными производными биотина, что привело к конъюгатам **4–7**, различающимся длиной спейсера. В данном случае под длиной спейсера подразумевается число линейно связанных атомов между спиртовой группой паклитаксела и тетрагидротиофеновым кольцом биотина.



Методом наноосаждения был получен ряд наночастиц на основе конъюгатов **1**, **3–7**. Установлено (Рисунок 7), что увеличение длины гидрофобного спейсера в их составе сопровождается постепенным понижением ζ -потенциала наноструктур, а также приводит к незначительному увеличению их размера. В то же время значение PDI НЧ изменяется неоднозначно, но постоянно остается ниже 0,2. Это указывает на то, что независимо от длины спейсера, наноструктуры, полученные из соответствующих конъюгатов, имеют узкое распределение по размерам и могут считаться монодисперсными. Кроме того, процесс получения НЧ сопровождается минимальными потерями конъюгатов, о чём свидетельствуют высокие значения эффективности инкапсуляции (близкие к 100 %), наблюдаемые во всех случаях.

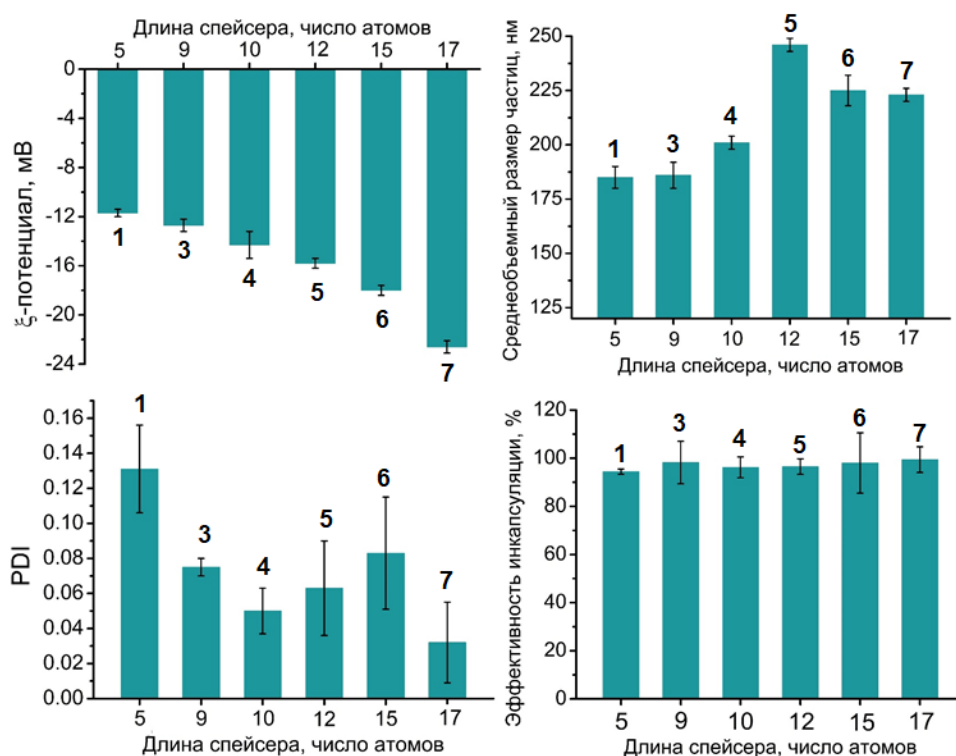


Рисунок 7 – Влияние длины спейсера в составе конъюгатов **1**, **3–7** на основные характеристики получаемых на их основе наночастиц.

Наночастицы конъюгатов продемонстрировали способность образовывать коллоидно-стабильные водные суспензии (Рисунок 8). Ключевые характеристики наноструктур, такие как размер и PDI, практически не изменялись при хранении при комнатной температуре и в холодильнике в течение как минимум 10 дней. Кроме того, была оценена коллоидная стабильность НЧ в среде, моделирующей плазму крови (Рисунок 9). Во всех случаях независимо от длины спейсера не было обнаружено существенных изменений в размере или PDI наноструктур, что говорит об их стабильности.

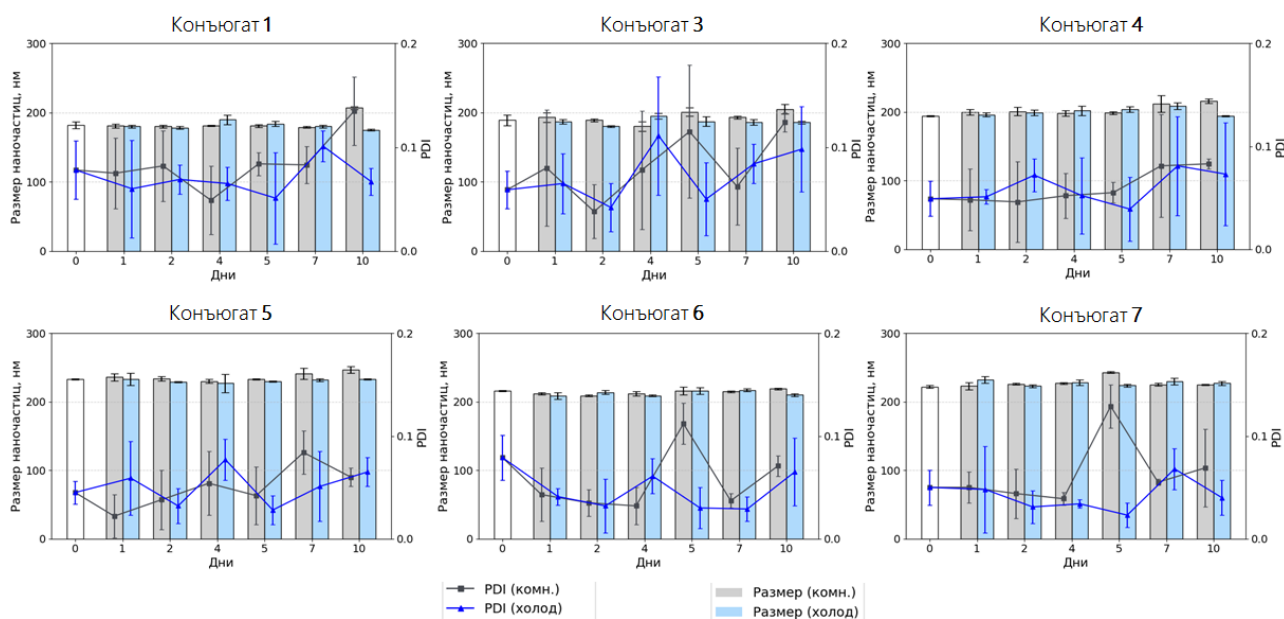


Рисунок 8 – Оценка коллоидной стабильности водных суспензий НЧ конъюгатов 1, 3–7 (1 мг/мл) при хранении при комнатной температуре (22 °С) и в холодильной камере (4 °С).

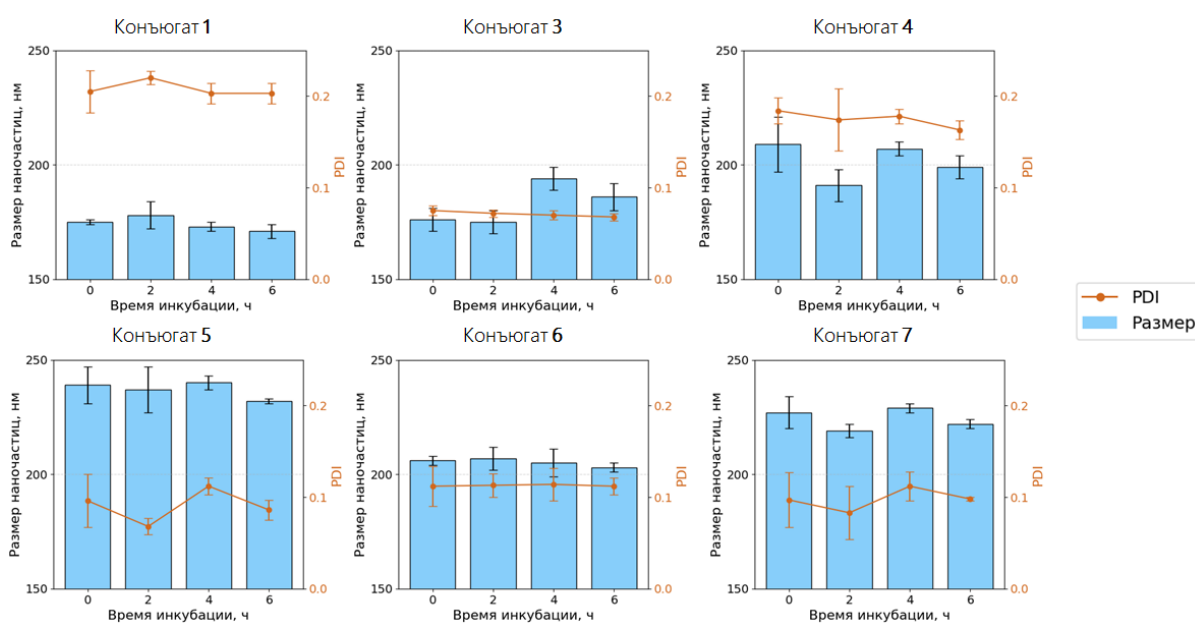


Рисунок 9 – Оценка коллоидной стабильности конъюгатов НЧ конъюгатов 1, 3–7 (1 мг/мл) в 50 % ФБС при 37 °С.

Помимо отсутствия значимого взаимодействия с белками плазмы, НЧ конъюгатов **1**, **3–7** практически не оказывают воздействия на эритроциты, то есть не обладают выраженной гемолитической активностью. Полученные наноструктуры в диапазоне концентраций от 125 до 500 мкг/мл вызывали гемолиз красных кровяных телец не более 1,5 %, что сопоставимо с коммерческой ЛФ РТХ (Рисунок 10). В совокупности это подтверждает целесообразность рассмотрения НЧ конъюгата паклитаксела с биотином, стабилизированных низкомолекулярным ПВС, в качестве перспективного инъекционного препарата для внутривенного введения. Включение гидрофобных спейсеров, содержащих до 17 линейно связанных атомов, в состав конъюгатов не влияет на возможность их самоорганизации в водной среде, а также на ключевые характеристики соответствующих наноструктур. Это открывает путь к разработке прототипа ЛФ на основе НЧ конъюгата, содержащего стимул-чувствительный линкер.

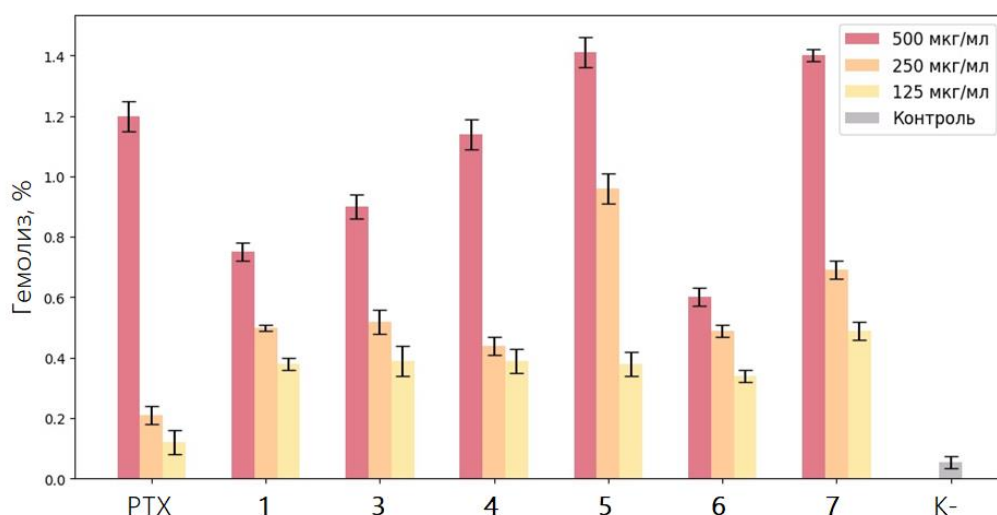


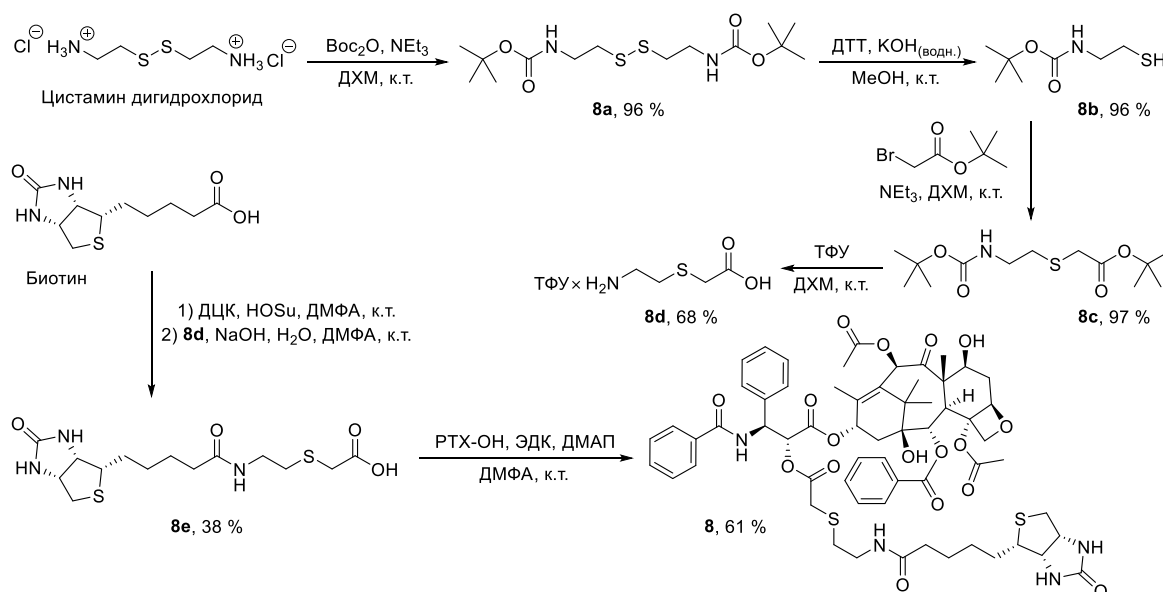
Рисунок 10 – Гемолитическая активность коммерческой лекарственной формы РТХ (Паклитаксел-Эбеве®), НЧ конъюгатов **1**, **3–7** и отрицательного контроля (К–, ФСБ) относительно положительного контроля (100 % гемолиза).

4. Синтез конъюгата со стимул-чувствительным линкером, получение наночастиц на его основе и оценка противоопухолевой активности.

В качестве стимул-чувствительного линкера, вводимого в состав конъюгата паклитаксела с биотином, была выбрана тиоэфирная группа, которая должна быть расположена вблизи сложноэфирной группы, связывающей паклитаксел с производным витамина. Синтез соответствующего конъюгата начинали с дигидрохлорида цистамина (Схема 5). На первой стадии его аминогруппы защищали *трет*-бутоксикарбонильной защитой, после чего дисульфидную связь в соединении **8a**

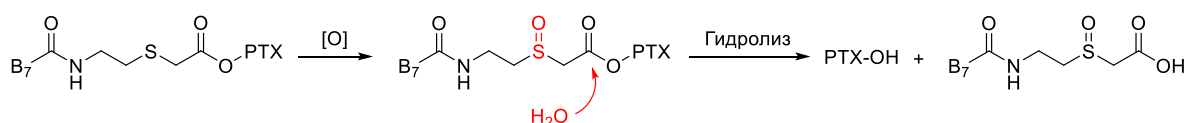
восстанавливали дитиотреитолом (ДТТ), что приводило к производному цистамина **8b**. Его тиольную группу далее алкилировали *tert*-бутилбромацетатом с образованием соединения **8c**, защитные группы которого удаляли действием трифторуксусной кислоты (ТФУ), что приводило к соли аминокислоты **8d**. Затем карбоксильную группу биотина активировали и присоединяли к соединению **8d**. Производным биотина **8e** далее ацилировали паклитаксел, что приводило к конъюгату **8**, содержащему стимул-чувствительный линкер. По данным ВЭЖХ чистота выделенного конъюгата **8** составила более 95 %.

Схема 5



Известно, что органические сульфиды могут окисляться активными формами кислорода (АФК), выработка которых повышена в опухолевых клетках. Предполагалось, что после рецептор-опосредованного эндоцитоза конъюгат **8** будет подвержен воздействию АФК, приводящему к окислению тиоэфирного линкера и появлению сильного электроноакцептора вблизи сложноэфирной группы, связывающей паклитаксел с производным биотина (Схема 6). Это должно облегчать нуклеофильную атаку молекулы воды по карбонильной группе и приводить к последующему гидролизу с высвобождением химиотерапевтического агента.

Схема 6



Было установлено, что конъюгат **8** обладал практически сопоставимой с паклитакселом цитотоксичностью на клетках карциномы поджелудочной железы

(Таблица 3). В то же время активность конъюгата **8** оказывалась на порядок выше по сравнению с активностью конъюгата **5** с почти такой же длиной линкера, но без тиоэфирного фрагмента. Это свидетельствует о том, что данная группировка играет ключевую роль в высвобождении химиотерапевтического агента из гибридной молекулы. При этом цитотоксический эффект обусловлен именно попаданием конъюгата паклитаксела и биотина в опухолевую клетку, поскольку воздействие биотина или его эквимольярной смеси с паклитакселом не возымело такого же эффекта.

Таблица 3 – Оценка цитотоксичности исследуемых веществ.

Вещество	Клеточная линия	
	PANC-1	MIA PaCa-2
	IC₅₀, нМ	
Паклитаксел	59 ± 5	9 ± 1
Конъюгат 8	62 ± 2	51 ± 3
Конъюгат 5	682 ± 30	758 ± 2
Биотин	>1000	>1000
Паклитаксел + биотин*	774 ± 13	559 ± 47

* – эквимольярная смесь.

Для оптимизации получения НЧ на основе конъюгата **8** способом наноосаждения (Рисунок 11) сначала при его фиксированной концентрации (1 мг/мл) варьировали содержание ПВС в суспензии. Найдено, что минимальный размер частиц наблюдался при концентрации стабилизатора 0,4 % (м/о) при PDI менее 0,2. Дальнейшее увеличение концентрации конъюгата **8** в суспензии приводило к заметному росту размера наноструктур и PDI. Поэтому были выбраны следующие оптимальные условия для их получения, а именно концентрация конъюгата **8** в суспензии 1 мг/мл и концентрация ПВС 0,4 % (м/о). Было получено три серии наночастиц конъюгата **8** в оптимальных условиях. Во всех случаях наблюдалась воспроизводимость основных характеристик прототипа лекарственной формы (Таблица 4). Установлено, что конъюгат **8**, как и остальные подобные соединения, при наноосаждении в ПВС формирует сферические наночастицы с различной оболочкой из стабилизатора (Рисунок 12).

Таблица 4 – Характеристика НЧ конъюгата **8**, полученных в оптимальных условиях.

Параметр	Значение
Среднеобъёмный диаметр частиц, нм	176 ± 5
PDI	0,066 ± 0,041
ζ-потенциал, мВ	-15,9 ± 0,6
Содержание конъюгата, мг во флаконе	0,89 ± 0,03
Содержание ПВС, мг во флаконе	3,95 ± 0,05
Эффективность инкапсуляции, %	93 ± 4
Доля доступного биотина, %	84 ± 1

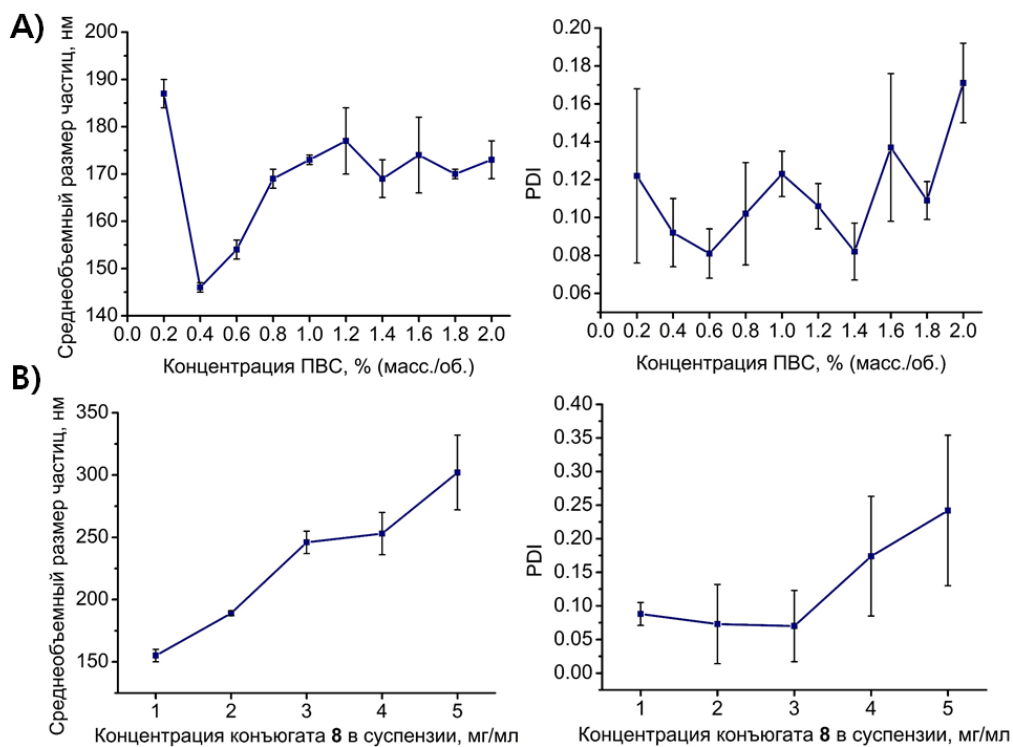


Рисунок 11 – Оптимизация процесса получения НЧ конъюгата 8 методом наносоаждения (пояснения см. в тексте).

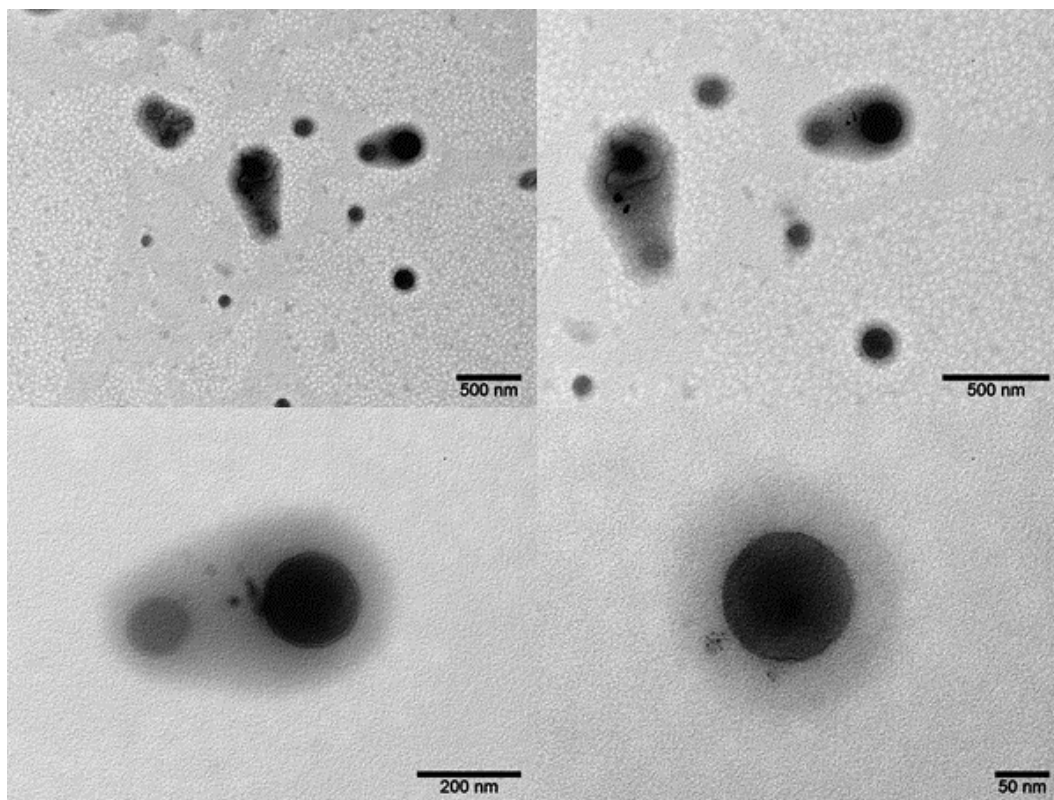


Рисунок 12 – Микрофотографии ПЭМ наночастиц конъюгата 8, полученные наносоаждением в оптимизированных условиях.

Суспензии наноструктур оказались стабильны в воде и физрастворе при хранении как при комнатной температуре, так и в холодильной камере в течение как минимум восьми дней (Рисунок 13). Таким образом, НЧ коллоидно-стабильны в среде,

в которой их можно ресуспендировать перед внутривенным введением. При этом ресуспендирование лиофилизата в меньшем объеме физраствора вплоть до концентрации конъюгата 5 мг/мл, сопоставимой с концентрацией РТХ в его коммерческих лекарственных формах, не приводило к агрегации, а также существенному изменению размера и PDI. Указанные характеристики НЧ конъюгата **8** также практически не менялись в средах, содержащих белок, что свидетельствует об их потенциальной стабильности в культуральной среде (при дальнейшем изучении цитотоксичности) и плазме крови (Рисунок 14). Кроме того, наноструктуры при разных концентрациях в среднем обладали гемолитической активностью, сопоставимой с той, что характерна коммерческой лекарственной форме паклитаксела (Рисунок 15). В совокупности, это делает допустимым как внутривенное введение таких НЧ, так и их циркуляцию в кровотоке, приводящую к накоплению в тканях злокачественного новообразования.

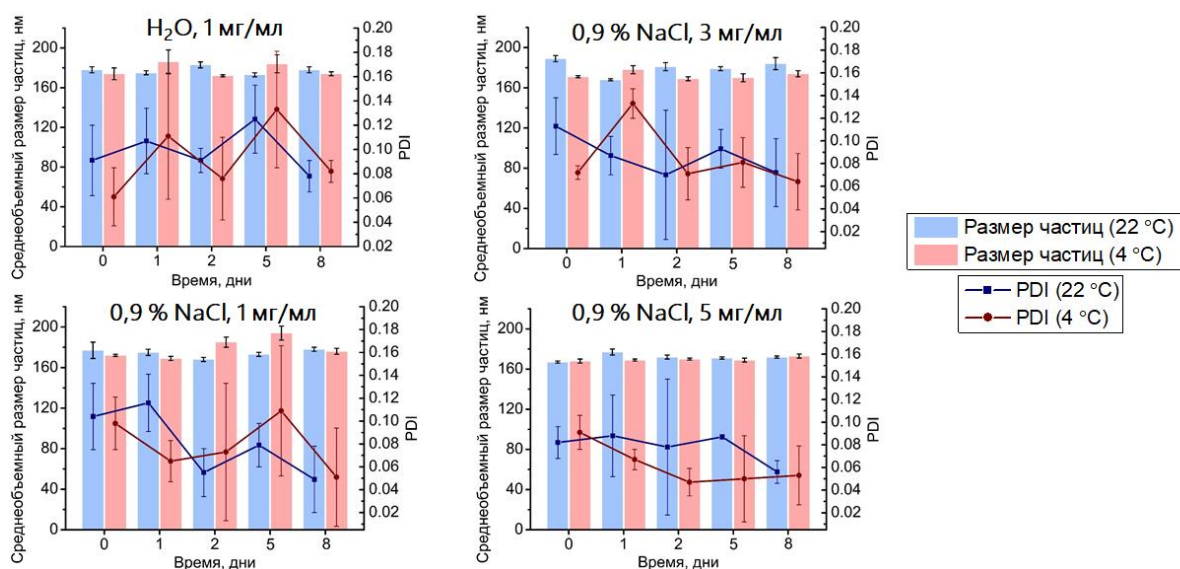


Рисунок 13 – Изучение коллоидной стабильности НЧ конъюгата **8** в воде и физрастворе при различных его концентрациях в суспензии и температурных режимах.

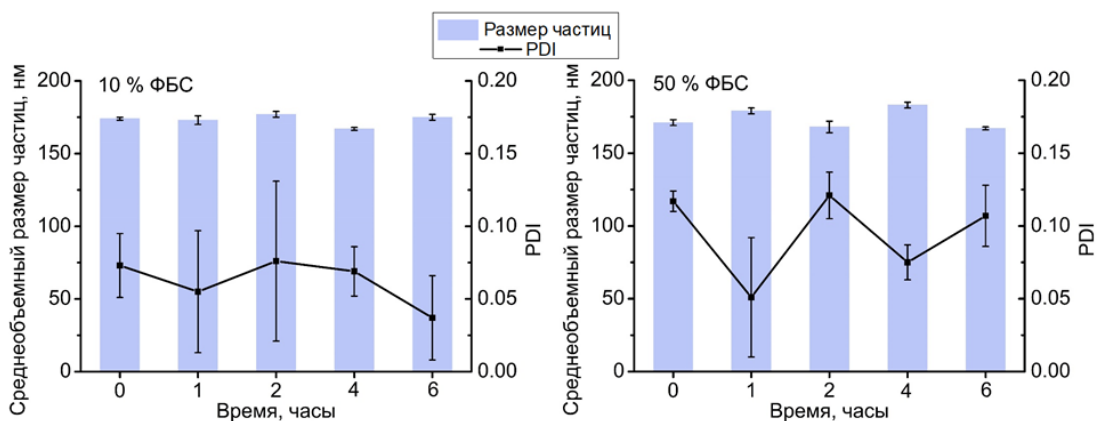


Рисунок 14 – Изучение коллоидной стабильности НЧ конъюгата **8** в средах, моделирующих культуральную среду (слева) и плазму крови (справа).

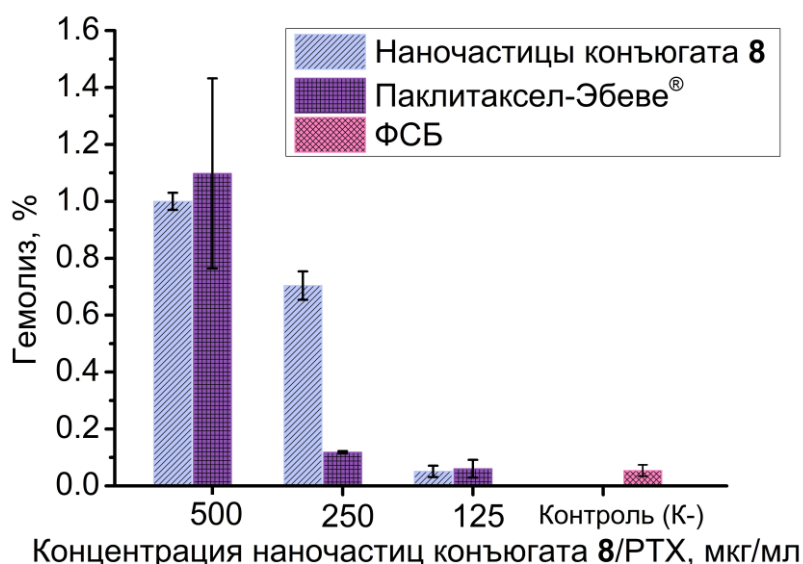


Рисунок 15 – Сравнительная гистограмма гемолитических активностей НЧ конъюгата 8 и коммерческой лекарственной формы РТХ (Паклитаксел-Эбеве®).

Установлено (Таблица 5), что цитотоксичность прототипа ЛФ на основе НЧ конъюгата 8 превышает на порядок цитотоксичность как НЧ конъюгата 5, так и Абраксана® — коммерческого химиотерапевтического препарата, представляющего собой комплекс паклитаксела и человеческого сывороточного альбумина, применяемого для лечения онкологических заболеваний, в частности поджелудочной железы. Это свидетельствует о том, что НЧ конъюгата 8 являются многообещающим прототипом лекарственной формы, предназначенной для химиотерапии.

Таблица 5 – Оценка цитотоксичности Абраксана® и наночастиц конъюгатов 8 и 5.

Препарат	Клеточная линия	
	PANC-1	MIA PaCa-2
	IC₅₀, нМ	
Абраксан®	460 ± 18	607 ± 52
НЧ конъюгата 8	56 ± 2	58 ± 4
НЧ конъюгата 5	576 ± 47	791 ± 33

5. Основные результаты и выводы.

При выполнении исследования были получены следующие результаты:

1. Получены новые типы конъюгатов паклитаксела с биотином.
2. Показана способность конъюгатов паклитаксела с биотином образовывать узкодисперсные наночастицы размером менее 200 нм в водных средах.
3. Оптимизирован способ получения НЧ конъюгатов 1 и 8 методом наноосаждения.
4. Разработан подход к получению конъюгата паклитаксела с биотином, содержащего стимул-чувствительный тиоэфирный линкер.

5. Установлено, что прототип лекарственной формы на основе конъюгата **8** со стимул-чувствительным линкером является перспективным химиотерапевтическим средством, цитотоксичность которого на клетках карциномы поджелудочной железы на порядок превышает цитотоксичность современного коммерчески доступного препарата «Абраксан®» на основе паклитаксела.

По представленной работе могут быть сделаны выводы:

1. Внедрение гидрофильного линкера, содержащего доноры и акцепторы водородных связей, в состав конъюгата паклитаксела с биотином препятствует способности гибридного соединения формировать коллоидно-стабильные наночастицы.
2. Наноструктуры с воспроизводимыми параметрами на основе конъюгатов паклитаксела с биотином могут быть получены методом наноосаждения.
3. Введение коротких гидрофобных линкеров в состав конъюгатов не оказывает существенного влияния на возможность получения на их основе самособирающихся наночастиц и на их ключевые характеристики, такие как коллоидная стабильность и гемолитическая активность.
4. Полученные наночастицы конъюгатов паклитаксела с биотином позволяют создать концентрацию химиотерапевтического агента в суспензии, сопоставимую с концентрацией паклитаксела в коммерчески доступных лекарственных формах, и являются приемлемыми для внутривенного введения.
5. Конъюгат паклитаксела с биотином, содержащий стимул-чувствительный тиоэфирный линкер, является перспективным пролекарством по сравнению с конъюгатом с нерасщепляемым аминокислотным линкером, благодаря повышенной цитотоксичности, обусловленной потенциальным облегчением высвобождения химиотерапевтического агента внутри опухолевых клеток.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность научному руководителю, д.х.н., проф. Кочеткову К. А. за содействие в подготовке работы, действенную помощь и внимание. Автор благодарен д.х.н., проф. Перегудову А. С. за помощь в регистрации спектров ЯМР, к.х.н., заведующей кафедрой аналитической химии Стахановой С. В. за обучение измерению ИК спектров, к.х.н. Никитину А. А. за помощь в изучении морфологии наноструктур, Куковьякиной Е. В. за проведение исследований биологической активности. Автор благодарен коллегам из НОЛ СДЛВ, лаборатории Нанофармацевтики, кафедры Химии и технологии биологически активных веществ РХТУ им. Д. И. Менделеева и лаборатории ГРЭОС ИНЭОС РАН за ценные советы и поддержку на всех этапах выполнения работы. Особую благодарность автор выражает Беляевой А. Ю., Казаковой Е. С., Жежер И. В. и Орлову В. О. за совместную работу по тематике диссертации и помощь, а также родным и близким за поддержку.

Список статей, опубликованных автором по теме диссертации

1. D. V. Beigulenko, E. S. Kazakova, T. S. Kovshova, K. A. Kochetkov. Development and examination of self-assembled nanoformulation of biotinylated paclitaxel derivative // *Mendeleev Communications*. — 2026. — Vol. 36, no. 3. — P. 298–300.
2. D. V. Beigulenko, V. O. Orlov, E. S. Kazakova et al. Synthesis and self-assembly behavior investigation of paclitaxel-riboflavin conjugates for targeted drug delivery to tumor cells // *Nano-Structures & Nano-Objects*. — 2025. — Vol. 45. — 101588.
3. D. V. Beigulenko, A. Y. Belyaeva, E. S. Kazakova et al. Evaluation of self-assembling properties of paclitaxel-biotin conjugates // *Nano-Structures & Nano-Objects*. — 2024. — Vol. 40. — 101375.
4. Д. В. Бейгуленко, Н. Ю. Шепета, К. А. Кочетков, С. Э. Гельперина. Витамин В12 как вектор для транспорта лекарственных веществ в опухоль // *Макрогетероциклы*. — 2022. — Т. 15, № 1. — С. 6–17.