

КОЛЛОИДНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЭТОПОЗИДА НА ОСНОВЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

© 2023 г. М. А. Меркулова¹, *, Н. С. Осипова¹,
А. В. Калистратова¹, Ю. В. Ермоленко¹, С. Э. Гельперина¹
¹Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
Миусская площадь, 9, Москва, 125047 Россия

*e-mail: ma.merk@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 03.08.2023 г.

Принята к публикации 03.08.2023 г.

В обзоре рассмотрены системы доставки этопозиды на основе коллоидных носителей — полимерных наночастиц и мицелл из синтетических и природных полимеров. Этопозид, ингибитор топоизомеразы II, занимает важное место в химиотерапии ряда опухолей, однако его применение часто ограничено ввиду выраженных побочных эффектов. Использование коллоидных систем доставки позволяет изменить фармакокинетические параметры этопозиды и повысить его накопление в опухолях, что приводит к усилению противоопухолевого эффекта. Особый интерес представляют стимул-чувствительные системы, реагирующие на специфические условия в микроокружении опухоли, что позволяет значительно повысить селективность действия препарата.

Ключевые слова: этопозид, системы доставки, полимерные наночастицы

DOI: 10.31857/S0023291223600463, EDN: DPYRBT

1. ВВЕДЕНИЕ

Этопозид (ETP, рис. 1а), противоопухолевый препарат широкого спектра действия, представляет собой производное 4'-деметилэпиподофилоксина (рис. 1б), растительного токсина, получаемого экстракцией из корней подофилла. Этопозид был синтезирован в 60-е годы прошлого века швейцарской компанией Sandoz Pharmaceuticals и в 1983 году вошел в клиническую практику под торговым названием Вепезид® (Bristol-Myers Squibb) [1]. В настоящее время этопозид входит в перечень ВОЗ основных лекарственных средств [2]. Основным его назначением является химиотерапия (преимущественно в комбинации с другими цитостатиками) герминогенных опухолей яичка и яичников и мелкоклеточного рака легких (МРЛ). Препарат применяют также при лечении других видов рака, в том числе лимфогранулематоз, острого монобластного и миелобластного лейкоза и пр. [3, 4].

Основной мишенью цитотоксического действия этопозиды является топоизомераза II — фермент, необходимый для транскрипции, репликации и сегрегации хромосом при делении клетки. Формирование тройного комплекса этопозиды с ДНК и топоизомеразой II в фазе активного клеточного

деления S и G2 приводит к торможению репликации ДНК, задержке пролиферации клеток и, как следствие, к их апоптозу [5, 6].

Этопозид отличается низкой растворимостью и относительно низкой кишечной проницаемостью, то есть принадлежит к IV классу по системе биофармацевтической классификации. Его биодоступность при пероральном введении составляет 40–75% в зависимости от дозы; при этом фармакокинетические показатели отличаются высокой интер- и интраиндивидуальной вариабельностью, которая по некоторым данным достигает 35% [1, 7] и затрудняет выбор оптимального режима лечения. Внутривенное введение препарата позволяет несколько снизить вариабельность (до 25% [7]); однако из-за низкой растворимости этопозиды в воде (150–170 мкг/мл [8]) в состав внутривенной формы Вепезиды® (Вепезид®, концентрат для инфузий, 20 мг/мл, Bristol-Myers Squibb) введены растворители и солюбилизаторы, в том числе полисорбат 80, вызывающий аллергические реакции. Позднее была разработана водорастворимая форма этопозиды Этопофос® (Bristol-Myers Squibb). Этопофос — фосфат этопозиды (рис. 1в) — представляет собой про-лекарство и при внутривенном введении уже через 15 мин превращается в этопозид. Хотя высокая растворимость Этопофоса в

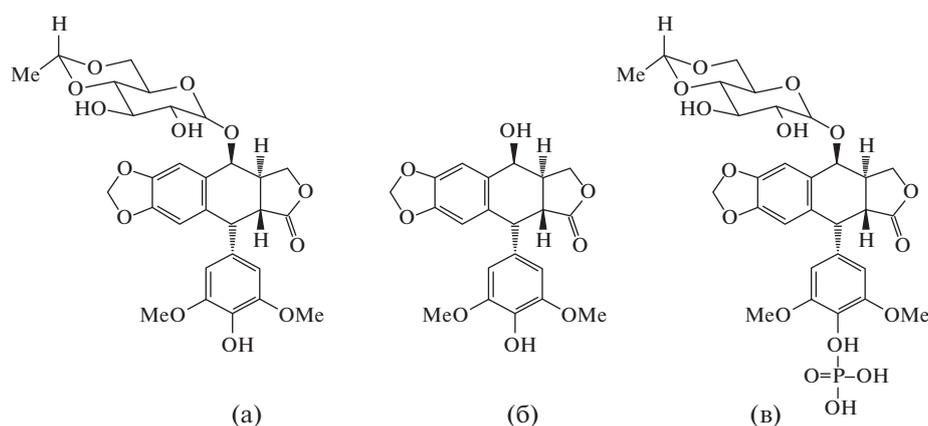


Рис. 1. Структурные формулы этопозида (а), 4'-деметилэпиподофиллотоксина (б) и этопозида фосфата (в).

воде (20 мг/мл) позволила отказаться от солиubilизаторов и таким образом несколько снизить побочные эффекты препарата и уменьшить объемы инфузии [9–11], фармакокинетические параметры и профиль токсичности Этопофоса и этопозида практически одинаковы.

Как отмечено выше, этопозид занимает важное место в химиотерапии ряда опухолей, однако его применение часто ограничено ввиду выраженных побочных эффектов, наиболее серьезным из которых является миелосупрессия (нейтропения и тромбоцитопения) [6, 12]. Кроме того, применение высоких доз этопозида связывают с повышенным риском вторичных миелоидных лейкозов [13, 14].

Очевидно, что для снижения дозы лекарственного вещества (ЛВ) при сохранении эффективности лечения необходимо повышение его концентрации в опухоли (то есть повышение селективности действия). Как показывают результаты многочисленных исследований, повысить эффективность доставки ЛВ в опухоль и снизить побочные эффекты позволяет использование коллоидных наноразмерных носителей. Первым и наиболее известным представителем наноносителей стали липосомы. Длительный опыт применения липосомальной формы противоопухолевого антибиотика доксорубина свидетельствует о его повышенной безопасности и переносимости по сравнению с традиционными лекарственными формами [15]. Среди альтернативных носителей особый интерес представляют наночастицы из синтетических и природных полимеров. Эти технологии отличает гибкость, обусловленная разнообразием полимеров, применяемых для получения наноносителей. К достоинствам полимерных наночастиц следует отнести стабильность и высокую емкость, а также возможность получения препаратов с контролируемой скоростью высвобождения ЛВ, возможность функционализации поверхности и пригодность для различных путей

введения в организм, в том числе для перорального и ингаляционного. Преимуществом полимерных мицелл является легкость их получения. При получении наночастиц и мицелл, предназначенных для парентеральных путей введения, используют только биodeградируемые полимеры. Здесь следует отметить, что с точки зрения фармацевтической технологии системы доставки ЛВ на основе наночастиц и других коллоидных наноносителей являются лекарственными формами, представляющими собой ЛВ, включенное в состав субмикронных частиц (сформированных в данном случае из полимеров), и для введения их в клиническую практику необходимо соответствие требованиям фармакопей [16, 17].

Способность наноносителей доставлять ЛВ в опухоль обусловлена различными механизмами. Прежде всего, это патофизиологические особенности некоторых опухолей, способствующие проникновению и накоплению частиц (эффект EPR, от англ. Enhanced Permeation and Retention). Кроме того, важную роль играет захват наночастиц циркулирующими в крови иммунными клетками, которые затем проникают в окружение опухоли (клеточно-опосредованный транспорт). В частности, клеточно-опосредованный транспорт в опухоль показан для липосом [18], полилактидных и альбуминовых наночастиц [19]. Доставке в опухоль способствует также повышение времени циркуляции инкапсулированных ЛВ в кровотоке; для этого наночастицы покрывают гидрофильной оболочкой, которая снижает их распознавание и захват макрофагами, локализованными в органах ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) (так называемый “стелс-эффект”). Следует отметить также доставку ЛВ в опухоль с помощью наноносителей, конъюгированных с биолигандом-вектором, способствующим их взаимодействию с рецепторами на поверхности опухолевых клеток и последующей интернализации (так называемый “активный транспорт” ЛВ). В литературе описаны вектора раз-

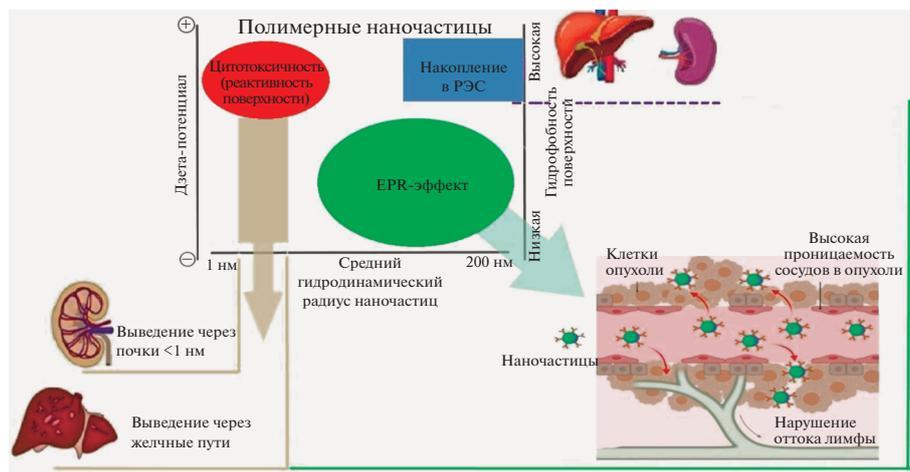


Рис. 2. Корреляции между физико-химическими параметрами наночастиц, их биораспределением и биосовместимостью. Основные независимые параметры: гидрофобность, диаметр наночастиц и дзета-потенциал. Зоны: красная – риск повышенной токсичности, зеленая – вероятно хорошая биосовместимость. Мелкие положительно заряженные наночастицы (красная зона), вероятно, будут токсичнее, чем более крупные гидрофобные наночастицы, которые быстро выводятся из организма через органы РЭС (синяя зона). Для доставки в опухоль посредством эффекта EPR наиболее пригодны отрицательно заряженные или нейтральные наночастицы размером 100–200 нм (зеленая зона) (адаптировано по данным [31] с помощью Biorender.com).

личных типов, в том числе, пептиды (например, проникающие в клетку RGD-пептиды [20, 21] или аналог соматостатина октреотид [22]), лектины [23], молекулы витаминов – D3 [24] или фолат [23] и др. Механизмы, контролирующие биораспределение различных наночастиц в организме и транспорт в опухоль, подробно освещены в обзорах [18, 25–27].

Эффективность системы доставки/наносомальной лекарственной формы, профиль ее распределения в организме и биосовместимость во многом зависят от физико-химических параметров носителя, в том числе от размера и заряда (дзета-потенциала) наночастиц и свойств поверхности (прежде всего, от гидрофобности), а также от содержания ЛВ и скорости его высвобождения. Все эти параметры в значительной степени можно контролировать, выбирая подходящий тип наночастиц и оптимальную технологию их получения [28–30]. Закономерности взаимосвязей между основными параметрами наночастиц и их поведением в организме иллюстрирует 3-D диаграмма (рис. 2) [31].

Несмотря на важную роль этопозида в химиотерапии рака, исследования систем его доставки относительно немногочисленны в сравнении, например, с доxorubicin: так, в базе данных Medline поиск по ключевым словам “etoposide, delivery systems” выявляет около 200 статей, а по словам “doxorubicin, delivery systems” – более 8 тыс. Тем не менее в литературе представлен широкий спектр коллоидных систем доставки этопозида, в том числе липосомы [32–34], различные типы мицелл [22, 35], твердые наночастицы, включая неорганические [36, 37], полимерные [38–41] и

липидные [42–45], а также более сложные системы “второго поколения”, такие как наночастицы типа “ядро–оболочка” [46], системы со-доставки этопозида в комбинации с другими противоопухолевыми агентами [47–52] и векторизованные системы [20]. Схематические изображения строения основных типов коллоидных носителей, использованных для доставки этопозида, приведены на рис. 3.

Данный обзор посвящен системам доставки этопозида на основе синтетических и природных полимеров, в том числе твердых наночастиц и мицелл. Основное внимание уделено исследованиям, направленным на установление взаимосвязи между

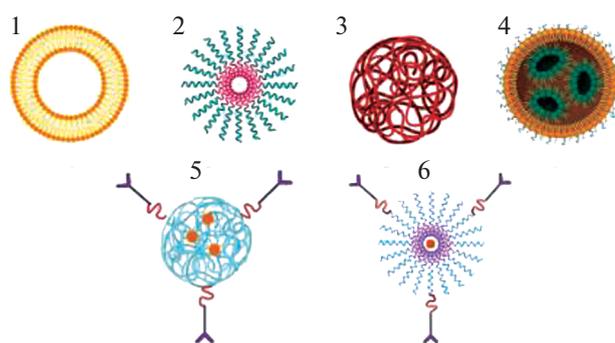


Рис. 3. Основные типы коллоидных носителей этопозида: 1 – липосомы, 2 – полимерные мицеллы, 3 – полимерные твердотельные наночастицы, 4 – наночастицы из твердых липидов, 5 – векторизованные полимерные наночастицы с включенным ЛВ, 6 – векторизованные полимерные мицеллы с включенным ЛВ (рисунок создан с помощью Biorender.com).

физико-химическими параметрами наночастиц и их поведением в организме, а также технологическим подходом, позволяющим контролировать эти параметры.

2. НАНОЧАСТИЦЫ ИЗ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ

2.1. Наночастицы из полилактидов

Большинство описанных в литературе наносомальных форм (наночастиц) этопозида получены на основе полилактидов, в частности, из сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA, от *англ.* Poly(Lactide-co-Glycolide) Acid). Благодаря способности к биodeградации, биосовместимости и низкой токсичности PLGA, наночастицы на его основе широко используются как носители ЛВ [53, 54]. В организме полилактиды подвергаются гидролизу с образованием нетоксичных метаболитов – молочной и гликолевой кислот. Для получения лекарственных форм, как правило, используют полилактиды фармацевтического качества, наиболее известными из которых являются полимеры марки Resomer® (Evonik Industries AG, Германия) и Purasorb® (Corbion, Нидерланды). Данные производители предлагают широкий ряд полимеров с варьируемым молекулярным составом, в том числе, с различными молярными соотношениями лактида и гликолида (состав PLGA обычно 85/15, 75/25 или 50/50 мол/мол, соответственно), молекулярными массами и типом концевых групп (–COOH или –OCH₃). Варьируя эти параметры, можно контролировать эффективность включения ЛВ, профиль его высвобождения из наночастиц и скорость деградации полимера. Основные способы получения наночастиц PLGA – наносоаждение и гомогенизация (эмульгирование) с последующим удалением растворителя – подробно рассмотрены в обзорах [55, 56]. Размер получаемых частиц и эффективность включения ЛВ зависят от параметров процесса, в том числе от метода получения, молекулярной массы PLGA и его строения, а также от соотношения ЛВ: полимер, концентрации и типа стабилизатора и др. Подобные тенденции характерны для большинства полимерных наночастиц [28–30]. Для получения наночастиц этопозида (ETP-PLGA) чаще используют PLGA 50/50 и блок-сополимеры PLGA с полиэтиленгликолем (PLGA-PEG).

В методе эмульгирования органическая фаза представляет собой раствор этопозида и PLGA в дихлорметане, хлороформе или этилацетате, а водная фаза содержит стабилизатор эмульсии (поверхностно-активное вещество, ПАВ). Обычно используют фармацевтические неионогенные полимерные ПАВ, например, полуксамер 188 (блок-сополимер полиэтиленоксида и полипропиленоксида, PEO₈₀-PPO₂₇-PEO₈₀) [38, 57], поливиниловый

спирт (ПВС) [58, 59] или TPGS (D-α-токоферил полиэтиленгликоль 1000 сукцинат) [58] и др. Однако наночастицы можно получать и в присутствии анионного ПАВ, такого как холат натрия [58]. Вначале путем ультразвуковой или механической гомогенизации получают первичную эмульсию (типа масло/вода), которую затем гомогенизируют под давлением для уменьшения размеров капель. В систематическом исследовании Yadav и соавт. [59] увеличение количества циклов гомогенизации от 1 до 4 и повышение давления от 5000 до 10000 пси привело к весьма значительному уменьшению размеров наночастиц ETP-PLGA от 600 до 100 нм. При этом рост массового соотношения ETP : PLGA от 1 : 10 до 1 : 4 приводил к снижению эффективности включения этопозида от ~80 до ~50%. Все частицы имели отрицательный дзета-потенциал в диапазоне от –15 до –30 мВ.

В лабораторных условиях наносоаждение (соосаждение) – простой и удобный метод получения наночастиц. Ограничением этой технологии является сложность ее масштабирования [60]. Для получения наночастиц методом наносоаждения раствор этопозида и PLGA в смешивающемся с водой растворителе медленно прибавляют в водную фазу, содержащую стабилизатор суспензии. Так, соосаждение этопозида и PLGA из раствора в ацетоне в водный раствор полуксамера 188 приводило к образованию узкодисперсных наночастиц ETP : PLGA размером 90–100 нм и дзета-потенциалом порядка –30 мВ [46]. Авторы использовали PLGA с различными молярными соотношениями мономерных звеньев лактид/гликолид (50/50, 75/25 и 85/15); массовое соотношение ETP : PLGA составляло 1 : 10. Эффективность включения этопозида возрастала по мере увеличения доли лактида (то есть по мере увеличения гидрофобности полимера) от 58 до 78% соответственно. Содержание этопозида в наночастице при этом также возрастало, однако оставалось низким (<1.5% в/в). В работе Calewart и соавт. [57] содержание этопозида в полученных наночастицах PLGA (50/50) удалось повысить до 7.3% в/в. Такой результат получен путем увеличения соотношения ETP : PLGA в реакционной смеси до 6 : 10 в/в. Однако эффективность включения этопозида при этом составила всего 13%.

Интересные результаты получили Saadati и соавт. [58]. Эти авторы сравнили влияние различных стабилизаторов (в том числе, ПВС, полуксамер 188, холата натрия и TPGS) в концентрациях от 0.1 до 1% на эффективность включения этопозида в наночастицы из PEG-PLGA, полученные путем наносоаждения и эмульгирования. В случае эмульгирования наиболее эффективными (включение >50%) оказались 0.3% ПВС и 0.1% TPGS, а для наночастиц, полученных осаждением – 0.5% ПВС. Однако в целом эмульгирование обеспечи-

вало более эффективное включение этопозида. Наилучший результат получен при одновременном использовании TPGS и ПВС: для обоих методов эффективность включения превысила 80%, а размеры наночастиц составляли 150–200 нм.

Как отмечалось выше, одним из основных параметров наносомальной лекарственной формы/системы доставки, определяющих ее эффективность, является кинетика высвобождения ЛВ из наночастиц. Именно от этого параметра зависит, какое количество ЛВ будет доставлено в орган- или клетку-мишень [62]. Помимо перечисленных выше технологических параметров, эффективность включения ЛВ в наночастицу и скорость его высвобождения зависят от сродства молекулы ЛВ к полимеру [63]. При разбавлении наносuspензии высвобождение ЛВ вначале происходит путем его десорбции и диффузии из полимерного ядра и лишь на поздних этапах этот процесс зависит от скорости деградации полимера [64]. Кинетику высвобождения ЛВ *in vitro* определяют путем инкубации наночастиц при 37°C в модельных средах, имитирующих физиологические условия. Если наночастицы предназначены для внутривенного введения, то такими условиями являются предельное разбавление (sink condition) наносuspензии в среде, имитирующей плазму крови (обычно 0.9% раствор NaCl или фосфатный буфер с pH 7.4) [65]. Поскольку этопозид трудно растворим, в среду иногда добавляют органические растворители или ПАВ, в том числе метанол [39], альбумин [66] или полисорбат 80 [51]. Для определения количеств высвободившегося и инкапсулированного этопозида наночастицы отделяют методом диализа [39, 57–59, 66] или центрифугированием [51]. В большинстве исследований использовали метод диализа, при этом данные о профиле высвобождения этопозида из наночастиц PLGA (50/50) несколько противоречивы. Так, в работах [66, 69, 70] наблюдали длительное высвобождение этопозида: 40–50% высвобождалось в течение 24 ч, при этом для полного высвобождения требовалось от 12 [69] до 40 сут [70]. В других исследованиях высвобождение этопозида из аналогичных наночастиц в основном завершалось в течение 48 ч [38, 39, 51]. Высвобождение этопозида замедлялось при повышении содержания лактида в полимере: если наночастицы из PLGA (50/50) высвобождали 50% этопозида за 1 час, то наночастицы из PLGA (75/25) и PLGA (85/15) удерживали 50% этопозида уже в течение 5 и 15 ч соответственно [38]. Этот феномен, вероятно, объясняется повышением сродства этопозида к полимеру с увеличением его гидрофобности. Упомянутое выше сочетание ПВС и TPGS не только повысило эффективность включения этопозида в наночастицы PEG-PLGA, но и значительно замедлило время его высвобождения (с 48 ч до 3 и 8 сут для наночастиц, полученных осаждением

и эмульгированием соответственно) [58]. Авторы предположили, что роль TPGS заключается не только в стабилизации эмульсии, но и в повышении сродства этопозида к полимеру. Добавление липидного компонента трикаприна (глицерин *трис*(деcanoат)), напротив, ускорило высвобождение этопозида из микросфер PLGA [71].

Известно, что фармакокинетические параметры наночастиц зависят от их геометрических параметров и свойств поверхности. Покрытие поверхности наночастиц нейтральными ПАВ, которые создают гидрофильную оболочку и препятствуют адсорбции белков-опсонинов, опосредующих захват наночастиц макрофагами (так называемая “стерическая стабилизация” или “стелс-эффект”), снижает клиренс (скорость элиминации из плазмы крови) и накопление в органах ретикулоэндотелиальной системы [72]. Повышению времени циркуляции наночастиц способствует также уменьшение их размеров.

Действительно, по данным Yadav и соавт. даже незначительное уменьшение размеров наночастиц PLGA, нагруженных радиоактивно меченным этопозидом (^{99m}Tc -ЕТР), от 160 до 105 нм приводит к снижению его накопления в печени, селезенке и легких и увеличению времени циркуляции (через 24 ч в плазме крови мышей найдено 1.08 и 3.98% введенной дозы соответственно) [73]. Стерическая стабилизация поверхности с помощью ковалентно связанного с наночастицами PEG (ЕТР-PLGA-mPEG) или путем покрытия наночастиц поллоксамером 188 (ЕТР-PLGA-P188) еще более эффективна: при внутривенном введении концентрации ^{99m}Tc -ЕТР в крови мышей через 24 ч достигали ~20% введенной дозы, при этом накопление в органах РЭС снизилось в 2–3 раза по сравнению с немодифицированными наночастицами [73]. Наночастицы из PLGA (85/15) размером 105 нм не только повысили время циркуляции этопозида (^{99m}Tc -ЕТР: $\text{AUC}_{0-\infty} = 57.76\% \text{ А ч/г}$, $\text{Cl} = 1.73 \text{ г/ч}$; ^{99m}Tc -ЕТР-PLGA: $\text{AUC}_{0-\infty} = 136.97\% \text{ А ч/г}$, $\text{Cl} = 0.73 \text{ г/ч}$), но и, подчиняясь эффекту EPR, обеспечили значительное – почти четырехкратное по сравнению со свободным ЛВ – увеличение его концентрации в подкожно имплантированной мышам лимфоме Далтона (~9% дозы) [74].

Противоопухолевый эффект наночастиц ЕТР-PLGA, к сожалению, остается малоизученным. В исследовании [69] противоопухолевый эффект наночастиц ЕТР-PLGA лишь незначительно превышал эффект свободного этопозида: индекс торможения роста опухоли, индуцированной подкожной имплантацией клеток лимфолейкоза P388 у мышей, составлял 88 и 75% соответственно. Препараты вводили внутрибрюшинно, что, по-видимому, и является причиной низкой эффективности наночастиц, поскольку такой способ, в отличие от

внутривенного, не позволяет обеспечить их накопление в периферической опухоли за счет эффекта EPR [75, 76].

В то же время результаты многих исследований *in vitro* свидетельствуют о том, что включение этопозида в наночастицы не только не снижает его цитотоксичность в отношении различных опухолевых клеток, но в ряде случаев позволяет ее повысить [57, 59, 66, 70]. Так, значения IC_{50} (концентрация, при которой погибает 50% клеток) для ETP-PLGA, ETP-PLGA-mPEG и ETP-PLGA-P188 в отношении клеток мышинового лейкоза L1210 составляли 6.2, 4.8 и 5.4 мкМ соответственно; при этом IC_{50} свободного этопозида была значительно выше – 18 мкМ. Клетки рака простаты человека DU145 менее чувствительны к этопозиду, однако и в этом случае наноформы проявили большую активность: значения IC_{50} для ETP-PLGA, ETP-PLGA-mPEG и ETP-PLGA-P188 составляли 75.1, 60.1 и 71.3 мкМ соответственно, против 98.4 мкМ для свободного ETP [59]. Аналогичная тенденция отмечена в работе [58]: включение этопозида в наночастицы PLGA значительно повышало его цитотоксичность в отношении клеток глиом крысы C6 и F98. Цитотоксичность ненагруженных наночастиц PLGA (плацебо) была низкой.

Можно полагать, что усиление цитотоксического действия при включении этопозида в наночастицы объясняется повышением его внутриклеточной концентрации в результате эффективного захвата наночастиц PLGA клетками путем эндоцитоза [59, 77]. Интересно, что в условиях *in vivo* модификация поверхности наночастиц PLGA полоксамером 188 и PEG позволила существенно оптимизировать фармакокинетику этопозида за счет снижения их захвата макрофагами РЭС; однако в опытах *in vitro* такая модификация не приводит к снижению цитотоксичности этих наночастиц по сравнению с немодифицированными частицами, то есть, по-видимому, не влияет на захват наночастиц опухолевыми клетками.

Исследования наночастиц этопозида на основе PLGA не остались в стороне от актуальных тенденций фармацевтической нанотехнологии, таких как использование систем для одновременной доставки двух ЛВ (со-доставка) и носителей, конъюгированных с молекулами-векторами.

2.2. Векторизованные наночастицы PLGA

Куо и соавт. [78] синтезировали наносистему, снабженную двумя векторами, для доставки этопозида в мозг. Следует отметить, что этопозид ограниченно проникает в мозг, поскольку является субстратом АТФ-зависимых трансмембранных белков-транспортеров (в том числе Р-гликопротеина и белков множественной лекарственной устойчиво-

сти MRP1 и MRP3), которые препятствуют его проникновению через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [79]. Векторы – лактоферрин (молочный белок из семейства трансферринов) и фолат – обеспечивают рецептор-опосредованный эндоцитоз наночастиц эндотелиальными клетками, формируемыми ГЭБ [80], и таким образом способствуют проникновению этопозида в мозг, минуя АТФ-зависимые транспортеры. Оба вектора, кроме того, способствуют проникновению наночастиц в клетки глиомы, гиперэкспрессирующие рецепторы к фолату и лактоферрину. Гибридные липид-полимерные наночастицы, состоящие из PLGA (85/15) и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-*N*-[карбоксо-PEG-2000] (DSPE-PEG (2000)-COOH), получали эмульгированием в присутствии этопозида; эмульсию стабилизировали катионным ПАВ – дидодецилдиметиламмоний бромидом (DMAVB). Размер наночастиц составлял ~180 нм, дзета-потенциал – ~70 мВ. Фолат и лактоферрин конъюгировали с наночастицами карбодиимидным методом. Двойная векторизация позволила в два раза увеличить коэффициент проницаемости наночастиц через монослой эндотелиальных клеток капилляров мозга человека НВМЕС (in vitro модель ГЭБ) по сравнению с обычными PLGA-PEG наночастицами и повысила их цитотоксичность в отношении клеток глиомы U87MG (снижение жизнеспособности на 80%) вследствие более эффективного захвата наночастиц клетками.

Godse и соавт. [81] изучали действие наночастиц ETP-PLGA, модифицированных галактозилированным хитозаном, на клетки злокачественной опухоли сетчатки глаза (ретинобластомы) человека Y-79, которые экспрессируют рецепторы к сахарам, в том числе к маннозе и галактозе. После адсорбции галактозилированного хитозана размер наночастиц составлял 150–160 нм, дзета-потенциал – ~25 мВ, эффективность включения – ~70%. Модификация наночастиц позволила повысить их накопление в клетках Y-79 (до 70% против 40% для немодифицированных частиц), однако не привела к увеличению их цитотоксичности.

2.3. Наночастицы для доставки двух ЛВ (системы со-доставки)

Концепция систем со-доставки ЛВ основана на гипотезе о возможности повысить эффективность химиотерапии путем одновременной доставки в опухолевую клетку двух активных веществ с различными механизмами действия; при этом наибольшая эффективность будет достигаться в случае их синергетического действия [82].

Maleki и соавт. [50] разработали метод получения наночастиц из mPEG-PLGA 50/50, содержащих этопозид и паклитаксел (ETP-PTX-PLGA). Если основной механизм цитотоксического действия этопозида – это ингибирование топоизомер-

разы II, то паклитаксел стимулирует сборку микротрубочек и ингибирует их динамическую реорганизацию, нарушая митотическую функцию клетки. Наночастицы, полученные наноосаждением в присутствии полисорбата 80, имели размер ~150 нм и отрицательный дзета-потенциал (-22 мВ); суммарное содержание ЛВ составляло ~8% в/в. Скорость высвобождения паклитаксела и этопозиды была примерно одинаковой (48 и 40% через 24 ч и 92 и 85% через 144 ч соответственно). Цитотоксичность наночастиц ЕТР-РТХ-PLGA в отношении клеток глиом человека (U87) и крысы (C6) *in vitro* лишь незначительно превышала показатели свободных ЛВ и их моноформ. В то же время *in vivo* эта комбинированная наноформа проявила значимый противоопухолевый эффект: средняя продолжительность жизни животных, получавших ЕТР-РТХ-PLGA, была выше, чем в группах, получавших комбинации свободных ЛВ и их моноформ (46, 69 и 76 дней соответственно). Более того 40% (2/5) животных, получавших внутривенно наночастицы ЕТР-РТХ-PLGA, прожили более 100 дней, тогда как животные, получавшие комбинации свободных ЛВ и их моноформ, прожили не более 65 дней [50].

В исследовании [51] наночастицы из PLGA 50/50, содержащие этопозид, а также комбинированные наночастицы, содержащие этопозид и паклитаксел, были получены методом эмульгирования под давлением в присутствии ПВС. Для повышения эффективности включения этопозиды в наночастицы PLGA авторы использовали его гидрофобное производное (4'-О-бензилоксикарбонил-этопозид, ЕТР-cbz), которое расщепляется под действием эстераз и таким образом является про-лекарством. Размер наночастиц, содержащих оба ЛВ, составлял 95 нм, дзета-потенциал -26 мВ, суммарное содержание ЛВ - ~8% в/в. Цитотоксичность наночастиц оценивали на панели клеток опухолей мозга мыши и человека. Наиболее чувствительными оказались клетки опухолей мыши - нейробластомы Neuro 2A и глиомы GL261 (IC₅₀ 0.053 и 7.1 мкМ соответственно); для клеток GL261 был отмечен синергетический эффект этопозиды и паклитаксела (индекс синергизма 0.9).

Противоопухолевую активность наночастиц из mPEG-PLGA, нагруженных этопозидом и цисплатином (размер ~70-80 нм, дзета-потенциал ~-2 мВ), изучали на моделях немелкоклеточного рака легких человека H460 и метастазирующей карциномы легких мыши 344SQ в сочетании с лучевой терапией [14]. Торможение роста опухоли было наиболее выраженным у животных, получавших комбинированную наноформу. Одновременное введение этопозиды и цисплатина в свободном виде или в виде наночастиц, нагруженных одним из ЛВ, было менее эффективным.

Наноформа может также улучшить биодоступность этопозиды при пероральном введении. Возможной причиной низкой биодоступности может быть высокая экспрессия Р-гликопротеина в микроворсинках тонкого кишечника, которая препятствует абсорбции этопозиды из энтероцитов. Действительно, включение этопозиды в наночастицы PLGA совместно с ингибитором Р-гликопротеина кверцетином (EQNP) существенно улучшило фармакокинетические показатели этопозиды при пероральном введении мышам [83]. Наночастицы EQNP размером 280 нм (дзета-потенциал -22 мВ) содержали этопозид и кверцетин в соотношении 1 : 10 в/в. По сравнению с препаратом Этопозид (этопозид в мягких желатиновых капсулах) эти наночастицы обеспечили четырехкратное увеличение интегрального показателя АUC и более чем в два раза повысили максимальную концентрацию этопозиды в плазме C_{max}. Наночастицы, нагруженные этопозидом без кверцетина, показали промежуточные значения.

Более сложную систему доставки для химиотерапии лекарственно-резистентного мелкоклеточного рака легких (МРЛ), сочетающую оба подхода, разработали Huang и соавт. [21]. В качестве противоопухолевых агентов использовали этопозид и малую интерферирующую РНК (siPIK3CA), которая селективно ингибирует экспрессию гена PIK3CA и таким образом блокирует пролиферацию клеток МРЛ. Ввиду лабильности siRNA, наночастицы из PLGA-PEG нагружали по отдельности siPIK3CA и этопозидом. Для нацеливания в клетки опухоли использовали два лиганда-вектора: антагонист G (A) - синтетический антагонист нейропептидов, который блокирует гастрин-высвобождающий пептид и таким образом ингибирует рост клеток МРЛ, и проникающий в клетку пептид ТАТ (T). Лиганды конъюгировали с PLGA-PEG карбодиимидным методом.

Ненагруженные наночастицы всех типов имели сферическую форму и размер ~170 нм (рис. 4) и положительный дзета-потенциал (24-35 мВ). Наночастицы с двумя векторами ЕТР-PLGA-A/T и siRNA-PLGA-A/T, полученные методом эмульгирования (м/в и в/м/в соответственно), имели размер ~200 нм и положительный дзета-потенциал 35-40 мВ.

Цитотоксичность этих наночастиц в отношении клеток МРЛ человека H69, экспрессирующих белок CD133 (маркер опухолевых клеток), была заметно выше по сравнению с наночастицами, модифицированными одним вектором, или свободными ЛВ (этопозидом и комплексом siRNA с полиэтиленгликолем). При совместном воздействии ЕТР-PLGA-A/T и siRNA-PLGA-A/T на клетки H69 (CD133+) наблюдался синергетический эффект (индекс синергизма <1).

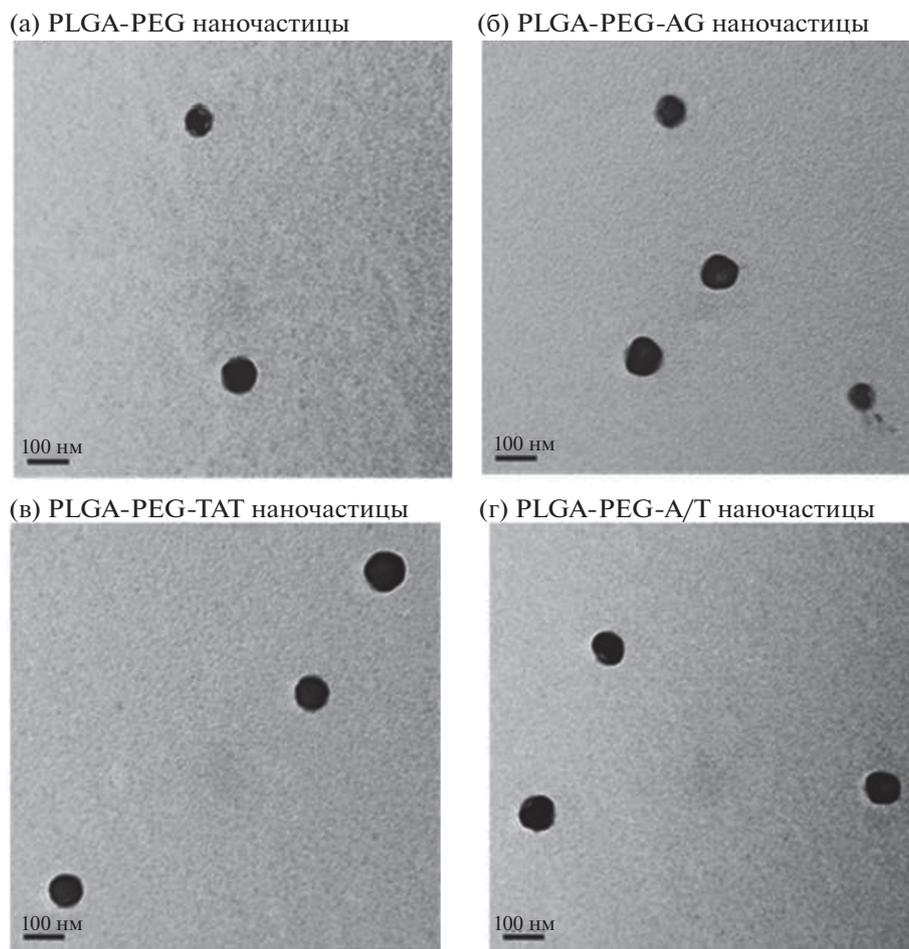


Рис. 4. Микрофотографии наночастиц: (а) PLGA-PEG, (б) PLGA-PEG-AG, (в) PLGA-PEG-TAT и (г) PLGA-PEG-A/T (просвечивающая электронная микроскопия, масштаб: 100 нм) (перепечатано из [21] с разрешения MDPI, Copyright © (2020) by the authors (CC BY 4.0 open access).

2.4. Наночастицы из поли-ε-капролактона

Поли-ε-капролактон (PCL) — синтетический алифатический полиэфир, который широко используют в медицине и биомедицинских исследованиях, в том числе для получения нано- и микро-размерных систем доставки [84]. По сравнению с полилактидами, PCL отличается более высокой гидрофобностью и значительно меньшей скоростью биodeградации [80]. В работе [38] наночастицы из PCL, нагруженные этопозидом (ETP-PCL), получали методом эмульгирования в присутствии полоксамера 188; размер частиц составлял ~250 нм, дзета-потенциал около -28 мВ. Как отмечалось выше, эффективность включения и скорость высвобождения этопозидов из наночастиц PLGA возрастает с увеличением гидрофобности полимера носителя. Параметры более гидрофобных наночастиц из PCL логично дополняют последовательность ETP-PCL > ETP-PLGA (85/15) > ETP-PLGA (75/25) > ETP-PLGA (50/50), где эффективность включения снижается от 80 до 58%, а время

высвобождения 50% включенного этопозидов — от 25 до 5 ч [38]. Аналогичная тенденция наблюдалась и для нагруженных этопозидом микросфер из PCL, PLGA (75/25) и PLGA (50/50) [86].

Высокая гидрофобность наночастиц ETP-PCL оказала влияние и на их фармакокинетику у мышей: по сравнению с наночастицами ETP-PLGA (85/15) более гидрофобные наночастицы ETP-PCL быстрее выводились из кровотока ($AUC_{0-\infty}$, % ч: 34.57 и 25.68; Cl , мл/мин: 2.89 и 3.90 соответственно) [38]. Эта разница может объясняться более активной опсонизацией наночастиц ETP-PCL, опосредующей их быстрый захват макрофагами органов РЭС. Быстрому захвату наночастиц ETP-PCL макрофагами может способствовать и их больший по сравнению с ETP-PLGA (85/15) размер (257 нм и 105 нм соответственно). Интересно, что наночастицы ETP-PLGA (85/15) в большей степени накапливались в печени, а ETP-PCL — в селезенке. Оба типа наночастиц значительно продлили время циркуляции этопозидов.

Куо и соавт. [87] синтезировали сложную векторизованную систему для доставки этопозидов в мозг на основе PCL, используя стратегию, разработанную ими ранее для наночастиц на основе PLGA [42] и твердых липидов [43]. В качестве векторов в данном случае были выбраны лектин пшеницы (wheat germ agglutinin, WGA) и фолиевая кислота (F); оба вектора способствуют проникновению наночастиц в эндотелиальные клетки и клетки глиомы. Гибридные наночастицы, состоящие из амфифильных диблок-сополимеров PEG-PCL с молекулярной массой 9.5 кДа (MPEG₁₁₄-PCL₄₀) или 14.5 кДа (MPEG₁₁₄-PCL₈₄) и липидного компонента DSPE-PEG (2000)-COOH, получали эмульгированием в присутствии неионогенного ПАВ — полуксамера 407 (Pluronic® F127). Наночастицы конъюгировали с векторами карбодиимидным методом с участием —COOH группы DSPE-PEG (2000)-COOH. Этопозид включали в наночастицы в процессе их формирования. Аналогично получали наночастицы, нагруженные доксорубицином и кармустином (BCNU). Размер наночастиц, модифицированных лектином и фолиевой кислотой (наночастицы WFNP) составлял 150–240 нм, дзета-потенциал был близок к нейтральному (~5 мВ). В соответствии с отмеченными выше корреляциями, в этом исследовании рост гидрофобности наночастиц (то есть увеличение молекулярной массы PCL) также сопровождался повышением эффективности включения этопозидов и снижением скорости его высвобождения. Сочетание двух векторов обеспечило наночастицам WFNP преимущество по цитотоксичности в отношении клеток глиобластомы человека U87MG и скорости проникновения через ГЭБ (модель *in vitro*, образованная совместной культурой клеток церебрального эндотелия, астроцитов и перитилов человека) по сравнению с не векторизованными и моно-векторизованными наночастицами. Взаимодействие наночастиц с рецепторами было подтверждено иммунофлуоресцентным методом. Такие же корреляции наблюдались и для наночастиц, нагруженных доксорубицином и кармустином.

2.5. Другие полимеры

Среди наночастиц из других полимеров заслуживает упоминания векторизованная система на основе гибридных полимер-липидных наночастиц типа “ядро—оболочка” для доставки этопозидов в клетки гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 *in vitro* и *in vivo* [88]. Наночастицы из биodeградируемого полимера полибутилцианоакрилата, нагруженные этопозидом (ETP-PBCA), получали эмульгированием в присутствии поливинилпирролидона, лецитина и холата натрия с последующим удалением растворителя. Оболочка наночастиц состояла из конъюгата бычьего сывороточного альбумина (BSA) с этилендиамином (E) и

гиалуроновой кислотой (HA). Гиалуроновая кислота выполняла роль вектора к рецептору CD44, экспрессируемому клетками HepG2 [89], а этилендиамин обеспечивал положительный заряд конъюгатов. Формирование системы происходило путем самосборки в результате электростатического взаимодействия между положительно заряженным конъюгатом BSA-E-HA (PI 7.3–9.0) и отрицательно заряженными полимерными наночастицами (дзета-потенциал ~–24 мВ); при этом система сохраняла отрицательный дзета-потенциал около –14 мВ; размер частиц составлял 123 нм. Полученные таким образом наночастицы, состоящие из ядра ETP-PBCA и оболочки из конъюгата BSA-E-HA, высвобождали этопозид *in vitro* в течение 10 ч. У мышей с подкожно имплантированной карциномой HepG2 такие наночастицы не только значительно пролонгировали время циркуляции этопозидов по сравнению с наночастицами без оболочки и свободным этопозидом (AUC_{0-∞} в плазме, ч мкг/мл: ~10.8; ~4.8; ~2.1 соответственно), но и повысили его концентрацию и время удерживания в опухоли. Наночастицы ETP-PBCA с оболочкой BSA-E-HA также проявили более высокую противоопухолевую активность по сравнению с другими группами, снизив темпы роста опухоли и повысив уровень апоптоза. Этот результат коррелировал с их более высокой цитотоксичностью в отношении клеток HepG2 *in vitro*.

3. НАНОЧАСТИЦЫ ИЗ БИОПОЛИМЕРОВ

3.1. Сывороточные альбумины

Среди природных полимеров, используемых для создания систем доставки ЛВ, важное место занимает человеческий сывороточный альбумин (HSA). Действительно, альбумин обладает многими свойствами идеального носителя: является универсальным переносчиком многих молекул, в том числе и ЛВ, нетоксичен и не иммуногенен, кроме того, обладает высокой солюбилизирующей способностью [90]. Этопозид хорошо связывается с белками плазмы: в крови присутствует всего около 4% несвязанного этопозидов, что является хорошей предпосылкой для получения его наносомальных форм на основе альбумина.

3.1.1. Наночастицы из альбумина, полученные без применения сшивающих агентов

Успешным примером применения наночастиц из “несшитого” альбумина в качестве носителя труднорастворимого ЛВ является препарат Абраксан® (Celgene), представляющий собой наночастицы паклитаксела и альбумина, которые получают методом эмульгирования под давлением без применения сшивающих агентов (nab®-технология, *от англ.* nanoparticle albumin bound). Этот процесс позволяет получить устойчивую наносус-

пензию с размером частиц ~130 нм, однако при разбавлении агрегаты быстро диссоциируют до частиц размером ~10 нм (размер молекулы HSA). Тем не менее роль альбумина в этом случае не ограничивается поддержанием коллоидной стабильности системы; несмотря на быструю диссоциацию pab®-наночастиц, он также играет роль вектора, способствуя кавеолин-зависимому трансцитозу ЛВ через эндотелий в периваскулярное пространство путем взаимодействия с рецептором gp60 (альфондин) на поверхности эндотелиальных клеток. Кроме того, данные о преимущественном, по сравнению со свободным паклитакселом, накоплении pab®-паклитаксела в опухолях предполагают, что в перитуморальном пространстве альбумин может связываться с гликопротеиновым рецептором SPARC (secreted protein acid and rich in cysteine), гиперэкспрессия которого наблюдается в экстрацеллюлярном матриксе многих опухолей.

Сведений о доставке этопозида в опухоль в составе “pab-наночастиц” в литературе не имеется, однако принцип pab-технологии применяли в ряде исследований для получения наноагрегатов этопозида и сывороточных альбуминов - человеческого (HSA) или бычьего (BSA).

Wang и соавт. [41] использовали принцип pab-технологии для получения наноагрегатов этопозида и BSA. Для получения наночастиц раствор этопозида в смеси хлороформ-этанол гомогенизировали под давлением с водным раствором BSA; органический растворитель удаляли под вакуумом. Размер частиц, дзета-потенциал, эффективность включения этопозида и его содержание в лиофилизате составляли 182.3 нм, 22.18 мВ, 86.44 и 8.49% соответственно. Сравнение профилей биораспределения свободного этопозида и наночастицы ЕТР-BSA при внутривенном введении показали, что наночастица увеличивает поступление этопозида в селезенку и легкие ($AUC_{\text{нано}}/AUC_{\text{ЕТР}}$ 4.61 и 2.92 соответственно), в то время как его поступление в сердце и почки снижается. Примечательным также было снижение миелосупрессии в группе, получавшей ЕТР-BSA: уровни лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов были ближе к контрольным значениям по сравнению со свободным этопозидом.

Плазменные альбумины HSA и BSA во многом схожи, однако в случае HSA применение pab-технологии привело лишь к солиubilизации этопозида; наноагрегаты при этом не образовывались [51]. Методами спектроскопии и молекулярного докинга установлено, что комплекс этопозида с HSA образуется в результате его связывания с субдоменом HSA III (IB) [91]. В то же время известно, что конформации BSA и HSA в водных растворах различны (BSA имеет более жесткую конформацию), что может отражаться на способности субдоменов IB и IIIA этих белков

связываться с гидрофобными молекулами [92]. Действительно, использование про-лекарства этопозида (4'-O-бензилоксикарбонил-этопозид, ЕТР-cbz, см. выше), отличающегося более высокой гидрофобностью (растворимость ЕТР-cbz и этопозида в воде 0.003 и 0.2 мг/мл соответственно), позволило получить не только наноагрегаты ЕТР-cbz-HSA, но и комбинированную наночастицу, содержащую ЕТР-cbz и паклитаксел (ЕТР-cbz-РТХ-HSA) в соотношении 1 : 1 (в/в). Полученные наносuspensions лиофилизировали без добавления криопротекторов. Размер всех наночастиц составлял 100–150 нм, дзета-потенциал –22 мВ. Суммарное содержание ЛВ в суспензии комбинированных наночастиц составляло 2 мг/мл. Цитотоксичность наночастиц изучали на панели клеток глиомы мыши и человека. Значения IC_{50} однокомпонентных наночастиц ЕТР-cbz-HSA и РТХ-HSA и свободных ЛВ совпадали. Для системы со-доставки ЕТР-cbz-РТХ-HSA показан синергетический эффект ЛВ на клетках глиомы GL261 и нейробластомы Neuro2A (индексы синергизма CI 0.9 и 0.56 соответственно). Цитотоксичность однокомпонентных и комбинированных наночастиц ЕТР-cbz и паклитаксела на основе HSA и PLGA (см. выше) в этом исследовании была примерно одинаковой. Этот феномен интересен с точки зрения выявления параметров, влияющих на поведение наночастиц в биологических средах. Действительно, несмотря на схожесть таких важных параметров, как размер и дзета-потенциал (размер всех частиц 95–150 нм, дзета-потенциал – от –22 до –27 мВ), наночастицы на основе HSA и PLGA при разбавлении в модельных средах ведут себя по-разному: первая сразу высвобождает все количество ЛВ, а вторая удерживает 95–85% в течение первых двух часов и не менее 50% ЛВ в течение 30 ч. Таким образом, хотя, как известно, при введении в организм разница в скорости высвобождения ЛВ из наночастиц существенно влияет на фармакокинетику и профиль биораспределения наночастиц [62, 93], в условиях эксперимента по определению цитотоксичности значимого различия между наночастицами на основе HSA и PLGA не обнаружено: оба типа наночастиц в равной степени обеспечили поступление этопозида в клетки и воздействие на внутриклеточные мишени.

3.1.2. Наночастицы из альбумина, полученные с помощью сшивающих агентов

Нагруженные этопозидом наночастицы на основе HSA (ЕТР-HSA) получают также путем десольватации (коацервации) белка с последующей сшивкой бифункциональными агентами. На характеристики получаемых частиц влияют такие параметры, как pH среды, концентрация HSA и степень его сшивки. При разработке систем до-

ставки этопозида на основе “сшитых” наночастиц HSA использовали те же подходы, что и для наночастиц на основе синтетических полимеров, то есть векторизацию наночастиц и разработку систем, содержащих два ЛВ, для со-доставки.

Интересная система со-доставки этопозида и изохинолинового алкалоида берберина на основе нанокристаллов этопозида и “сшитых” наночастиц HSA описана в работе [94]. Роль берберина, ингибитора топоизомераз I и II и протеинкиназы C и индуктора активных форм кислорода, заключалась в усилении цитотоксического действия этопозида. Гибридную систему BER/ETP-HSA (“2 в 1”) получали путем включения нанокристаллов этопозида в альбуминовую наночастицу, сформированную путем десольватации (коацервации) альбумина этанолом в присутствии берберина. Для повышения стабильности наночастиц альбумин “сшивали” бифункциональным агентом – генипином или глутаровым альдегидом (в том числе, в присутствии нитрата цинка). Для направленной доставки в опухоль альбумин конъюгировали с двумя векторами-лигандами к рецепторам на поверхности опухолевых клеток – аминоксидин-бороновой кислотой (лектиномиметик, APBA) и маннозой (Mann) – для связывания с сиаловой кислотой и D-манноза-связывающим лектином соответственно. Размеры векторизованных (APBA–Mann–ETP-HSA) и невекторизованных (BER/ETP-HSA) наночастиц составили 173 и 216 нм соответственно, содержание этопозида в обоих случаях – около 14% в/в. Скорость высвобождения этопозида из наночастиц зависела от типа сшивающего агента. В случае наночастиц с двумя векторами, сшитых глутаровым альдегидом, 20 и 50% этопозида высвобождалось за 10 и 70 ч соответственно; берберин высвобождался быстрее. Противоопухолевую активность наночастиц изучали на модели карциномы легких мышей, индуцированной внутрибрюшинным введением уретана. Преимущество векторизованных наночастиц по сравнению со свободными ЛВ выражалось в значительном снижении числа и размеров очагов в легких, а также в изменении уровня экспрессии маркеров ангиогенеза (VEGF↓), пролиферации (Ki67↓) и апоптоза (caspase-3↑), свидетельствующих о торможении роста опухоли. Противоопухолевый эффект был выше в случае наночастиц APBA–Mann–ETP-HSA, конъюгированных с двумя векторами. Наблюдалась также тенденция к росту цитотоксичности в отношении клеток аденокарциномы легких человека A549 в ряду APBA–Mann–ETP-HSA > Mann-BER/ETP-HSA > APBA-BER/ETP-HSA > BER/ETP-HSA (через 24 ч инкубации снижение IC₅₀ по сравнению с этопозидом в 3.6, 3.0, 2.34 и 1.38 раза соответственно).

3.2. Другие биополимеры

Особый интерес представляют технологии создания векторизованных стимул-чувствительных наночастиц, высвобождающих ЛВ только при воздействии определенного внешнего фактора (стимула). Такая технология позволяет значительно повысить селективность действия системы доставки. Факторами, влияющими на скорость высвобождения ЛВ, могут быть присутствие во внешней среде восстановителя или изменение pH. Так, pH-чувствительные наночастицы сохраняют целостность и хорошо удерживают ЛВ в кровотоке (pH 7.4), но разрушаются, попав в микроокружение опухоли, для которого характерен ацидоз, и/или в лизосомы (клеточные органеллы с кислой внутренней средой, pH 4.4–5.5).

Сложную гибридную pH/редокс-чувствительную наносистему для со-доставки siRNA-EZH2 и этопозида в немелкоклеточную карциному легких A549 синтезировали Yuan и соавт. [20]. Полимер-носитель получали взаимодействием окисленного периодата хитозана с полиэтиленгликолем; затем к полученному графт-сополимеру (CP) через дисульфидный мостик присоединяли липоевую кислоту и активированные производные PEG и циклического RGD-пептида (cRGDyC-PEG). В такой системе хитозан-полиимин (CP) служил основой и обеспечивал положительный заряд для электростатического связывания siRNA. Липоевая кислота выполняла функцию гидрофобного и редокс-чувствительного блока; конъюгированный через спейсер RGD-пептид (cRGDyC-PEG) служил вектором и пролонгировал время циркуляции наночастиц. Наночастицы cPCPL/ETP получали методом упаривания растворителя, прибавляя раствор этопозида в дихлорметане к водному раствору полимера-носителя; затем растворитель удаляли и добавляли siRNA. Полученные таким образом наночастицы cPCPL/siRNA/ETP имели размер 111 нм, узкое распределение по размерам и дзета-потенциал ~7 мВ. В присутствии восстановителя дисульфидных связей глутатиона (GSH) или при понижении pH структура редокс-чувствительных наночастиц разрушалась, что приводило к ускоренному высвобождению ЛВ (рис. 5).

Система со-доставки эффективно ингибировала рост и метастазирование ортотопической (то есть локализованной в легких) карциномы легких A549. siRNA вызывала снижение экспрессии EZH2, которое, в свою очередь, не только приводило к снижению миграционной активности и инвазивности опухолевых клеток, но и усиливало цитотоксический эффект этопозида путем регуляции клеточного цикла. Вектор cRGDyC заметно усиливал противоопухолевый эффект (рис. 6).

Известны также примеры получения нагруженных этопозидом наночастиц с использованием дру-

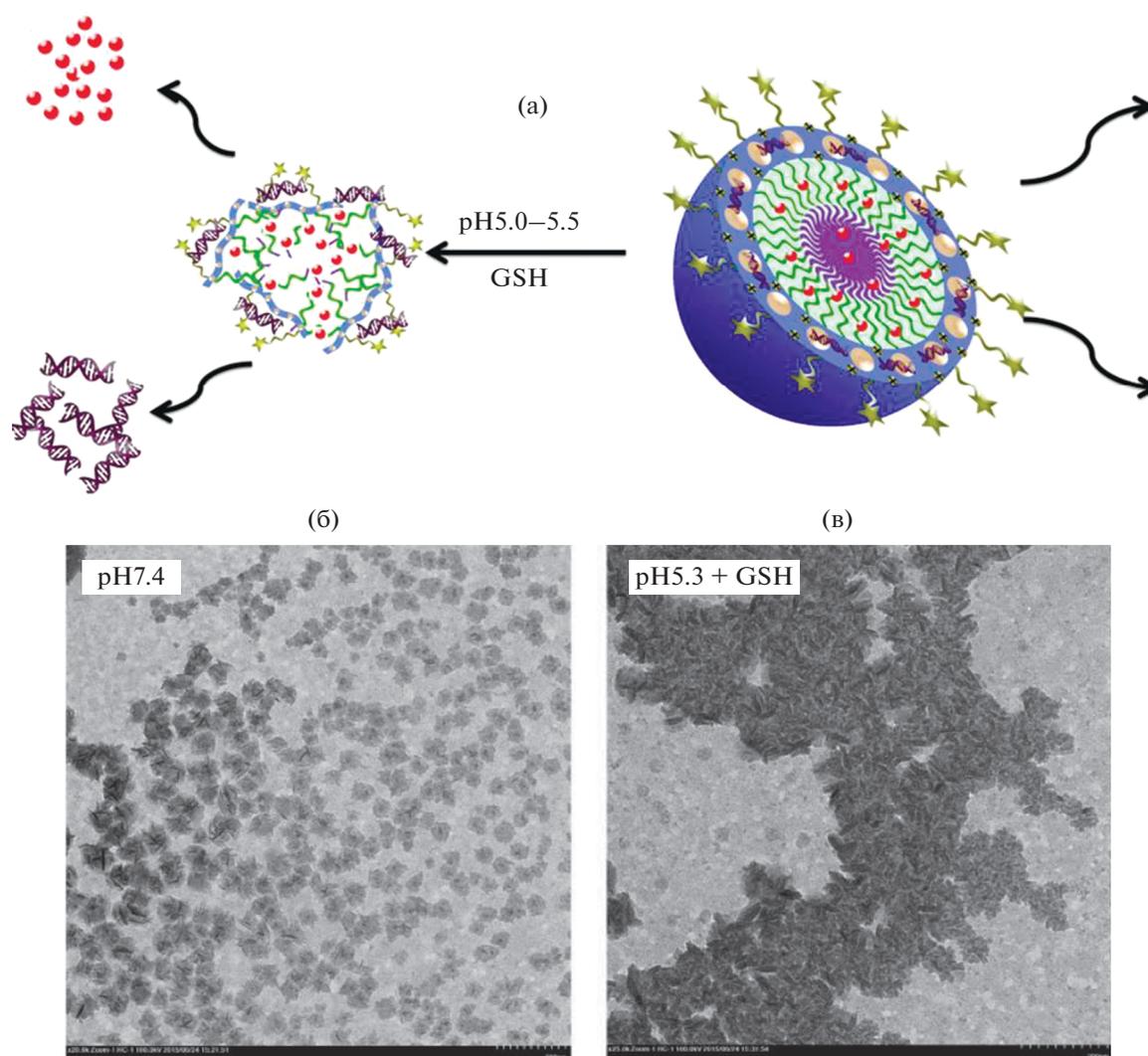


Рис. 5. (а) Схематическое изображение редокс-чувствительных наночастиц сPCPL/siRNA/ETP; (б, в) микрофотографии наночастиц при pH 7.4 и 5.3 в присутствии глутатиона (просвечивающая электронная микроскопия) (перепечатано из [20] с разрешения Elsevier, Copyright© 2017).

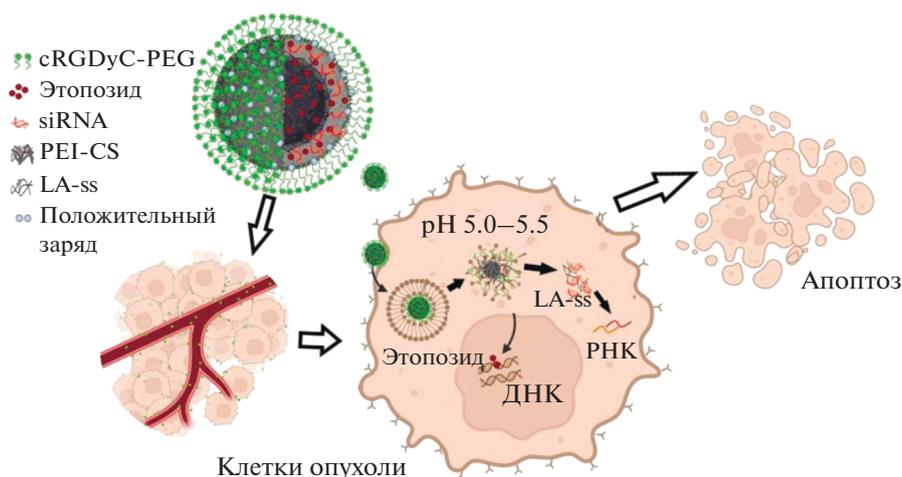


Рис. 6. Схема интернализации pH/redox-чувствительной наносистемы (сPCPL/siRNA/ETP NPs) для со-доставки siRNA и этопозид в клетки опухоли. PEI-CS – графт-сополимер хитозан-полиимин, LA-ss – липоевая кислота, присоединенная к PEI-CS через дисульфидный мостик (адаптировано из [20] с помощью Biorender.com).

гих биополимеров, в том числе, лактоферрина [95] и поли-3-гидроксibuтирата [96], полимера бактериального происхождения из ряда полигидроксиканоатов.

4. СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ МИЦЕЛЛ

Полимерные мицеллы представляют собой самоорганизующиеся в водной среде структуры типа ядро–оболочка из амфифильных полимеров. Ядро мицеллы, образованное гидрофобными блоками полимера, служит наноконтейнером для липофильных соединений, а оболочка из гидрофильных блоков (корона) стабилизирует границу раздела фаз между гидрофобным ядром и окружающей водной средой и обеспечивает защиту мицеллы от опсонизации в кровотоке, повышая вероятность достижения мишени (опухоли) в результате эффекта EPR. Свойства мицелл можно регулировать, выбирая полимер с подходящим гидрофильно-гидрофобным балансом, молекулярно-массовыми характеристиками, солюбилизующими и связывающими свойствами. Как показывают многочисленные экспериментальные и теоретические исследования, солюбилизация соединения тем эффективнее, чем ближе соответствие между его полярностью и гидрофобностью ядра мицеллы. Как и в случае наночастиц, основными параметрами, определяющими эффективность мицелл как систем доставки, являются содержание ЛВ, скорость его высвобождения, размер мицелл и особенно их стабильность. Эти параметры напрямую связаны с фармакокинетикой и профилем биораспределения включенного в мицеллы ЛВ. Примером успешного практического применения этой технологии является препарат Genexol®-PM (Samyang Co., Сеул, Корея) – мицеллярная форма паклитаксела на основе низкомолекулярного сополимера mPEG-PLA (размер мицелл 24 нм, дзета-потенциал –8.1 мВ). Современное состояние исследований в области систем доставки на основе мицелл представлено в обзорах [44, 97, 98].

4.1. Мицеллы из синтетических полимеров

Для получения мицеллярных форм этопозид (как и в случае других гидрофобных ЛВ) используют амфифильные блок-сополимеры с разнообразными гидрофобными блоками, однако гидрофильным блоком в большинстве случаев является PEG или его метиловый эфир (mPEG): например, PCL-mPEG (PCL-PEG) и PLA-PEG [99–103], D- α -токоферил полиэтиленгликоль сукцинат (TPGS) [104, 105] или конъюгаты PEG с жирными кислотами (C₁₄–C₂₂) [106]. Описаны также мицеллы для со-доставки этопозид в комбинации с другими ЛВ на основе триблок-сополимера поли-

пропиленгликоля и PEG (полоксамер P84, PEG₁₉PPG₄₃PEG₁₉) [107], блок-сополимера поли- γ -бензил-L-глутамата и PEG [108], а также триблок-сополимеров поли-2-алкил-2-оксазолинов, не содержащих PEG [109, 110].

Мицеллы получают методом диализа или методом упаривания растворителя (его иногда называют “методом получения пленки”). В зависимости от природы полимера его растворяют вместе с этопозидом в органическом растворителе или в воде. При использовании метода диализа этопозид растворяют в высококипящих растворителях, смешивающихся с водой (например, ДМСО или ДМФА). Формирование мицелл и загрузка в них этопозид происходит при смешивании органического и водного растворов и длительном перемешивании при комнатной температуре. После формирования мицелл органический растворитель удаляют диализом. Напротив, для получения пленки этопозид растворяют в легколетучих растворителях, таких как ацетон, ацетонитрил или абсолютный этанол. Органический растворитель удаляют в вакууме на роторном испарителе; образующую пленку восстанавливают водой, полученный мицеллярный раствор гомогенизируют с помощью ультразвука и лиофилизируют. Для изучения профиля высвобождения этопозид из мицелл используют метод диализа.

Как отмечено выше, свойства мицелл зависят от полимера-носителя. Так, в работе [100] сравнивали способность мицелл из сополимеров mPEG-*b*-PCL разного состава солюбилизировать гидрофобные ЛВ, в том числе этопозид, паклитаксел, плюмбагин, куркумин и индометацин. Мицеллы получали методом упаривания растворителя с последующей гидратацией образовавшейся пленки. Солюбилизирующая способность мицелл зависела от соотношения молекулярных масс гидрофобных и гидрофильных блоков (в целом, увеличение массы гидрофобного блока приводило к росту растворимости), при этом для каждого из сополимеров количества инкапсулированных ЛВ возрастали в следующем порядке: этопозид, паклитаксел, плюмбагин, куркумин и индометацин. Интересно, что эффективность солюбилизации этих веществ была весьма разной: при использовании мицелл из mPEG₁₁₄-*b*-PCL₁₉ растворимость этопозид возросла в 2.62 раза, паклитаксела – в 1068 раз, а куркумина – в 130100 раз. Эти результаты хорошо совпадали с расчетными значениями совместимости ЛВ с гидрофобным ядром мицеллы. Таким образом, в данном исследовании совместимость этопозид с PCL и, соответственно, эффективность его солюбилизации оказались невысокими.

Как известно, важной проблемой, связанной с применением мицелл как носителей ЛВ, может быть их недостаточная стабильность. Мицеллы ста-

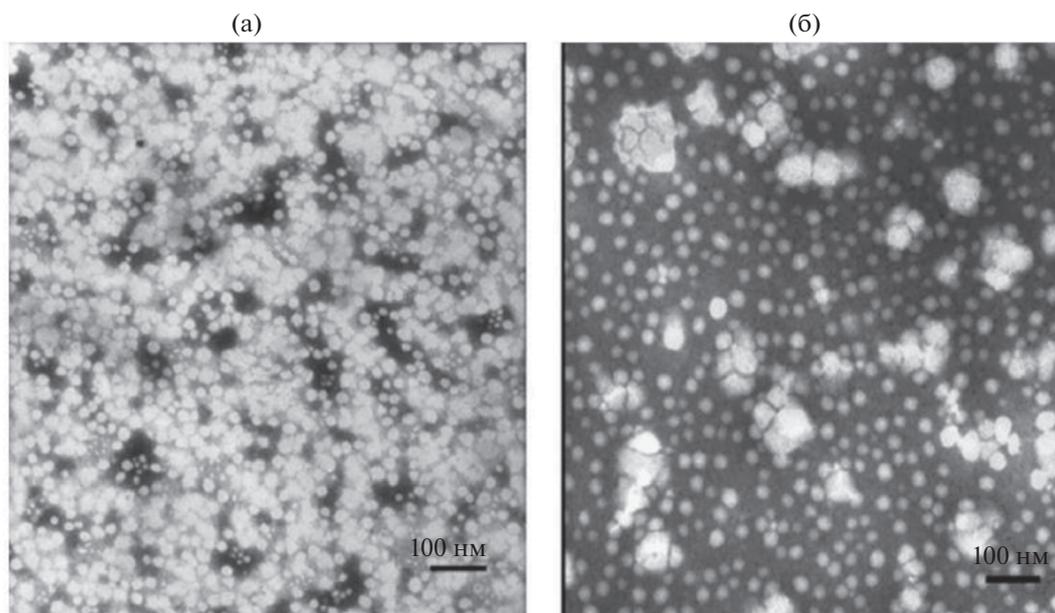


Рис. 7. Морфология нагруженных этопозидом мицелл ETP-mPEG-PLA (а) и ETP-mPEG-PCL (б) (просвечивающая электронная микроскопия, масштаб 100 нм) (перепечатано из [101] с разрешения Elsevier, Copyright© 2015).

бильны только при концентрациях выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ), а при концентрациях ниже ККМ они распадаются. Между тем, при введении в кровоток мицеллы подвергаются весьма значительному разбавлению и попадают в среду, содержащую природные солюбилизаторы – белки, что может приводить к их разрушению и несвоевременному высвобождению ЛВ. Удачное решение этой проблемы предложили Kataoka и соавт., синтезировавшие мицеллы из полимера, гидрофобные фрагменты которого в процессе мицеллообразования вступали в реакцию полимеризации, образуя стабильное ядро [111]. Wang и соавт. [112] использовали ту же идеологию для мицеллярной формы этопозида, но предложили альтернативный путь: они получили мицеллы из сополимера PEG и PCL звездчатой структуры (star-PEG-PCL₁₆), синтезированного путем использования дендримера РАМАМ-ОН с 16 ветвлениями в качестве инициатора полимеризации. В этом случае вначале методом диализа получали мицеллы star-PEG-PCL₁₆, а потом нагружали их этопозидом, доксорубицином и индометацином. Солюбилизация этопозида оказалась наиболее эффективной (его содержание достигало 22% в/в), видимо, в силу его более высокой гидрофобности. По цитотоксичности мицеллярная форма не уступала свободному этопозиду. Недостатком мицелл star-PEG-PCL₁₆ была склонность к агрегации: по-видимому, 16 ветвлений дендримера оказалось недостаточно для создания плотной гидрофильной оболочки и молекулярные мицеллы в водной среде образывали

ассоциаты размером >70 нм. Действительно, мицеллы, полученные с использованием дендримера с 32 ветвлениями (star-PEG-PCL₃₂), были более стабильны и высвобождали 60% этопозида в течение 24 ч; однако содержание этопозида в них было ниже, чем в мицеллах star-PEG-PCL₁₆ – всего 7.8% в/в, что может быть связано с более плотной упаковкой ядра в этих мицеллах [113]. Аналогичные мицеллы, синтезированные на основе PLA (star-PEG-PLA₃₂), содержали 4.3% в/в этопозида. Более низкое содержание в этом случае объяснялось меньшей гидрофобностью ядра из PLA по сравнению с PCL.

Влияние полимера-носителя прослеживается и в работе Chen и соавт. [101]. Нагруженные этопозидом мицеллы ETP-mPEG-PLA и ETP-mPEG-PCL получали методом упаривания растворителя. Физико-химические свойства мицелл были схожи, хотя мицеллы ETP-mPEG-PCL были несколько крупнее и эффективнее включали этопозид (ETP-mPEG-PLA: 15–20 нм и 85%, ETP-mPEG-PCL: 45–50 нм и 98%) (рис. 7).

Схожими были и профили высвобождения этопозида (70–80% за 5 ч). В опыте *in vitro* мицеллы ETP-mPEG-PLA лучше захватывались клетками карциномы легких человека H460 и проявили более высокую цитотоксичность (значения IC₅₀ 2.81 и 7.46 мкг/мл соответственно); при этом обе мицеллярные формы были менее активны, чем свободный этопозид (IC₅₀ 1.67 мкг/мл). Однако в опыте *in vivo* свободный этопозид и мицеллярная форма ETP-mPEG-PLA в равной степени тормозили рост опухоли H460 у мышей (форма ETP-

mPEG-PCL была гораздо менее активной), при этом форма ETP-mPEG-PLA проявляла значительно меньшую токсичность, чем свободный этопозид. Обе мицеллярные формы в 4–6 раз повысили интегральный показатель AUC и значительно снизили клиренс этопозидов по сравнению со свободным ЛВ.

4.2. Векторизованные мицеллы из синтетических полимеров

В ряду мицелл на основе PCL следует отметить две векторизованные системы доставки этопозидов. Мицеллы, полученные из смеси $\text{HOOC-PEG-}b\text{-PCL}$ и $\text{CH}_3\text{O-PEG-}b\text{-PCL}$, конъюгировали с пентапептидом Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) [114]. Связываясь с рецептором $\alpha 4\beta 1$ интегрина, EILDV способствует интернализации мицелл в клетки метастатических опухолей, которым свойственна гиперэкспрессия этого рецептора. Размер мицелл, полученных методом упаривания растворителя, увеличивался с ростом молекулярной массы полимера от 46 до 80 нм для 5.5 или 12 кДа соответственно; заряд составлял ~ -9 мВ, содержание этопозидов — 3.4–3.8% в/в. По сравнению с мицеллами без вектора или свободным этопозидом, векторизованные мицеллы эффективнее ингибировали метастазирование меланомы B16F10 в легкие мышей. Такая же тенденция наблюдалась в клеточных экспериментах: векторизованные мицеллы активнее подавляли миграционную активность клеток B16F10 и их способность к адгезии.

Аналогичные результаты были получены для нагруженных этопозидом мицелл из PEG-PCL, конъюгированных с пептидом YIGSR (Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg) — фрагментом ламинина, опосредующим его связывание с высокоаффинным рецептором 67 LR на поверхности опухолевых клеток [102]. Гликопротеин ламинин — компонент экстраклеточного матрикса, участвующий в процессах роста, ангиогенеза и метастазирования опухолей. В экспериментах *in vitro* мицеллярный этопозид медленнее проникал в клетки B16F10, и его цитотоксический эффект достиг максимума лишь через 72 ч инкубации, тогда как свободный этопозид активно подавлял пролиферацию клеток уже через 24 ч. Авторы связывают этот феномен с медленным высвобождением этопозидов из мицелл (16% за 24 ч инкубации). Однако *in vivo* векторизованные мицеллы активнее подавляли рост опухолей B16F10 в легких мышей по сравнению с мицеллами без вектора и свободным этопозидом.

О преимуществе векторизованных мицеллярных форм этопозидов свидетельствуют и результаты исследований мицелл из TPGS, конъюгированного с глицерретиновой кислотой (ETP-TPGS-GA) [100] или лактобионовой кислотой (ETP-TPGS-LA) [104]. Хотя TPGS, представляющий собой сложный эфир сукцината D- α -токо-

фериловой кислоты и PEG 1000, является скорее олигомером, мицеллярные формы на его основе заслуживают упоминания благодаря их высокой активности в отношении экспериментальной гепатоцеллюлярной карциномы (HCC, фатальный рак печени человека) HepG2, перевитой мышам. Выбор этих векторов обусловлен наличием соответствующих рецепторов на гепатоцитах и клетках HepG2. Мицеллы, полученные методом упаривания растворителя, имели разные размеры и дзета-потенциалы (ETP-TPGS-GA: 70–90 нм, -16 мВ, ETP-TPGS-LA: 140 нм, $+14$ мВ). Мицеллы ETP-TPGS-LA высвобождали $\sim 25\%$ этопозидов в течение 120 ч, ETP-TPGS-GA — 30% за 24 ч. Несмотря на различные параметры, оба типа мицелл накапливались преимущественно в печени и ингибировали рост HCC значительно более эффективно, чем свободный этопозид или мицеллы без вектора. Интересно, что в обоих исследованиях было отмечено снижение экспрессии Р-гликопротеина в опухоли. Этот феномен, по-видимому, обусловлен ингибированием активности этого транспортера под действием TPGS [115].

4.3. Мицеллы из синтетических полимеров для со-доставки двух ЛВ

Амфифильный триблок-сополимер поли-2-метил-2-оксазолина и поли-2-бутил-2-оксазолина (POX , $\text{P}(\text{MeO}_x\text{-}b\text{-BuO}_x\text{-}b\text{-MeO}_x)$) — редкий пример неPEGилированного мицеллообразующего полимера. Использование этого сополимера позволило не только получить бинарные мицеллы с высоким содержанием этопозидов в комбинации с цисплатином или паклитакселом, но и установить влияние этих ЛВ на форму мицелл — еще один важный параметр, влияющий на поведение наночастиц в организме. Мицеллы, нагруженные этопозидом (ETP POX) и его комбинациями с паклитакселом (ETP/PTX POX) [52] и цисплатином (ETP/C6CP POX) [110], получали методом пленки. Учитывая гидрофильный характер цисплатина, для загрузки в мицеллы использовали его гидрофобное про-лекарство (бис-гексаноат цисплатина, C₆CP). В мицеллах ETP POX его содержание было весьма высоким и составляло 43% в/в; в бинарных мицеллах (ETP/C6CP POX) общее содержание ЛВ достигало 52% в/в. Мицеллы ETP/C6CP POX сохраняли устойчивость в водной среде в течение 2 недель, их размер составлял 75–100 нм в зависимости от нагрузки. Интересно, что по мере увеличения нагрузки этопозидов мицеллы ETP POX и ETP/C6CP POX вытягивались и приобретали продолговатую (червеобразную) форму. Бинарные мицеллы ETP/PTX POX, напротив, стремились сохранять сферическую форму даже при значительных нагрузках этопозидов.

Изучение этого феномена методом молекулярного моделирования показало, что, хотя и

этопозид, и паклитаксел имеют гидрофобный характер, в ядре мицеллы они распределяются по-разному: если молекулы этопозида в основном локализованы в центре ядра, то молекулы паклитаксела тяготеют к периферическим зонам мицеллы [52]. Такой характер распределения может указывать на снижение поверхностной энергии мицелл в присутствии паклитаксела, что предполагает повышение их устойчивости. Это предположение подтверждает и снижение ККМ полиоксазолиновых мицелл в присутствии паклитаксела. Этопозид также снижает ККМ, но в значительно меньшей степени. Авторы полагают, что механизм стабилизирующего действия паклитаксела не ограничивается его гидрофобным взаимодействием с полимером, роль играют и другие факторы, такие как водородные связи и диполь-дипольные взаимодействия. Как отмечено выше, форма мицелл (как и других полимерных наночастиц) оказывает значительное, хотя и часто неоднозначное влияние на их фармакокинетические параметры и накопление в опухоли [116]. Так, например, известно, что по сравнению со сферическими мицеллами червеобразные мицеллы дольше циркулируют в крови. Вероятно, зная характер взаимодействия ЛВ с полимером, можно контролировать форму мицелл и в некоторой степени и их биораспределение. Так, в данном случае форму бинарных мицелл с этопозидом определял выбор “партнера” – паклитаксела или цисплатина.

Мицеллы РОХ, нагруженные этопозидом в сочетании с цисплатином (алкилатор) [110] или палбоциклибом (ингибитор циклин-зависимой киназы 4/6, CDK4/6) [109], эффективно доставляли эти ЛВ в опухоли и проявляли синергетический противоопухолевый эффект. Синергизм этопозида с цисплатином и палбоциклибом обусловлен тем, что в первом случае он, ингибируя ДНК-топоизомеразу II, предотвращает репарацию повреждений ДНК, вызванную цисплатином, а во втором – убивает опухолевые клетки, которые находятся в S-фазе и не чувствительны к ингибированию циклин-зависимой киназы CDK4/6.

Оба типа полиоксазолиновых мицелл – и ЕТР/С6СР РОХ, и ЕТР РОХ – обеспечили эффективную доставку этопозида в опухоль (мелкоклеточную карциному легких человека H69AR, перевитую иммунодефицитным мышам), причем в случае бинарных мицелл доставка этопозида была более эффективной: соотношения $AUC_{\text{опухоль}}/AUC_{\text{плазма}}$ составляли 3.34 и 2.58 соответственно [110]. Данные биораспределения коррелировали с противоопухолевым эффектом: в группе, получавшей мицеллы ЕТР/С6СР РОХ, средняя продолжительность жизни увеличилась на 50% по сравнению с контролем (45 и 69 дней соответственно), при этом 2/3 животных прожили >90 дней. В группе ЕТР РОХ эффективность была несколько ниже. Противоопухолевый эф-

фект, в свою очередь, коррелировал с данными эксперимента *in vitro*: мицеллы ЕТР/С6СР РОХ показали высокую цитотоксичность и синергетический эффект в отношении клеток H69AR и 344SQ/Luc (немелкоклеточная аденокарцинома легких мышей). Мицеллярная форма ЕТР/С6СР РМ оказалась также значительно менее токсичной, чем свободные этопозид и цисплатин: максимально переносимые дозы ЛВ в составе мицеллярной формы превышали дозы свободных ЛВ приблизительно в 7 раз. Аналогичные результаты получены для бинарных мицелл РОХ, нагруженных этопозидом и палбоциклибом. Мицеллы способствовали доставке этих ЛВ в мозг и значительно повысили продолжительность жизни мышей с интракраниальной медуллобластомой [109].

4.4. Стимул-чувствительные мицеллы из синтетических полимеров

Высвобождение ЛВ из мицелл обычно происходит при разбавлении коллоидной системы (например, сразу после введения мицелл в кровоток, что не всегда желательно). Однако возможно получение и стимул-чувствительных мицелл, устойчивость которых зависит от внешних факторов. Как и в случае наночастиц, одним из таких факторов является изменение pH внешней среды. Получить такие мицеллы можно, включив в состав образующего их сополимера pH-чувствительный блок.

Vai и соавт. [22] синтезировали нагруженные этопозидом многофункциональные мицеллы на основе PEG-*b*-поли- γ -бензил-L-глутамата (PEG-*b*-PBLG). Благодаря содержанию дисульфидных и боратных сложноэфирных связей, мицеллы были чувствительны как к изменениям pH, так и к присутствию восстановителя глутатиона, повышенный уровень которого в опухолях связывают с их прогрессированием [117]. Кроме того, мицеллы содержали в качестве флуоресцентной метки тетрафенилэтилен (ТРЕ, хромофор, для которого свойственна агрегационно-индуцированная эмиссия) и конъюгированный пептид октреотид (ОСТ) – в качестве вектора к опухолевым клеткам с гиперэкспрессией рецепторов соматостатина. Для конъюгации хромофора ТРЕ с сополимером PEG-*b*-PBLG использовали дисульфидное производное ТРЕ-SS-NH₂; затем проводили дальнейшую модификацию полимера 3-аминобензилбороновой кислотой в присутствии дигидроксифенетиламина. Мицеллы получали методом диализа. В процессе формирования мицелл происходила сшивка ядра в результате образования сложноэфирных боратных связей. Стабилизированные таким образом мицеллы (CCLMs, core-cross-linked micelles) были устойчивы в нейтральной среде без глутатиона (рис. 8). Повышение кислотности среды (pH 5) и присутствие глу-

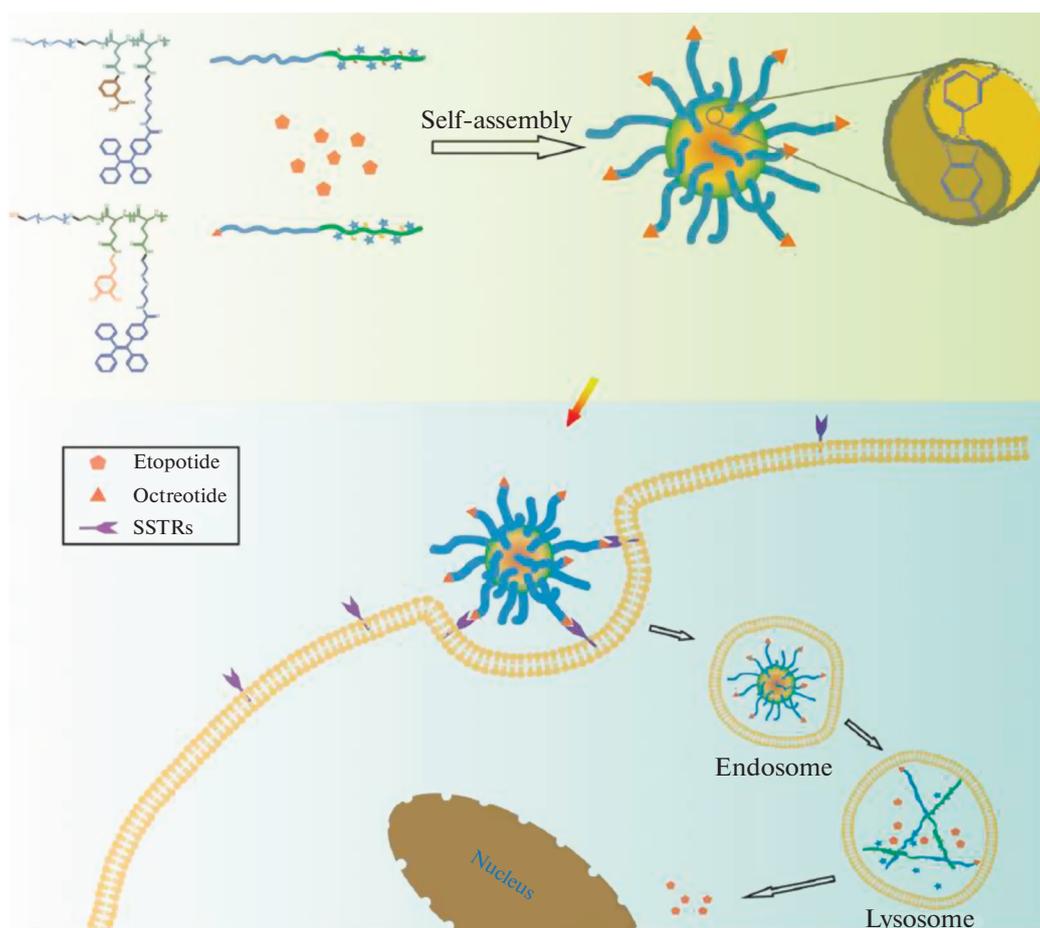


Рис. 8. Схема, иллюстрирующая эндоцитоз стабилизированных мицелл CCLMs, нагруженных этопозидом, в клетки, экспрессирующие рецептор к соматостатину (SSTR), и высвобождение этопозида в ответ на изменение условий окружающей среды (кислая среда в лизосомах, присутствие глутатиона) (перепечатано из [22] с разрешения American Chemical Society, Copyright© 2019).

татиона приводило к их дестабилизации и повышению скорости высвобождения этопозида.

Для оценки эффективности доставки этопозида в опухоль и противоопухолевой активности использовали перевитую мышам нейроэндокринную опухоль *Wn-1*, экспрессирующую рецепторы к соматостатину. По сравнению со свободным этопозидом, мицеллярная форма значительно повысила его накопление в опухоли и замедлила ее рост (через 20 дней объемы опухолей составляли 480 и 374 мм³ соответственно).

Jo и соавт. [118] использовали для получения pH-чувствительных мицелл сополимер mPEG-PCL с цитраконовым ангидридом (mPEG-pH-PCL), содержащий сложноэфирные связи, которые гидролизуются при кислых значениях pH, и нагрузили их ЛВ с разными механизмами противоопухолевого действия — этопозидом (ETP, ингибитор топоизомеразы II), паклитакселом (PTX, стабилизатор микротрубочек) и рапамицином (RAPA, ингибитор протеинкиназы mTOR) (рис. 9). Мицеллы

PTX/ETP/RAPA, полученные методом гидратирования пленки, имели размер 35 нм (рис. 10) и дзета-потенциал -22 мВ и содержали ЛВ в соотношении 2 : 2 : 1 (2.49, 2.59, и 1.38%) соответственно. Оценка цитотоксичности свободных ЛВ в отношении модифицированных клеток аденокарциномы желудка человека AGS-Luc2 выявила их синергетическое действие. Однако цитотоксичность мицелл была ниже по сравнению со свободными ЛВ, что, как полагают авторы, объясняется медленным высвобождением ЛВ из мицелл (50, 52 и 59% за 48 ч для PTX, ETP и RAPA соответственно).

При изучении фармакокинетики у мышей интегральный показатель в плазме для мицелл PTX/ETP/RAPA был в 1.6–3.0 раза выше, чем для свободных ЛВ. Отмечено также снижение накопления в печени паклитаксела при введении его в составе мицелл. Однако дизайн эксперимента (отсутствовали мицеллы без pH-чувствительного фрагмента в качестве контрольной группы) не позволил

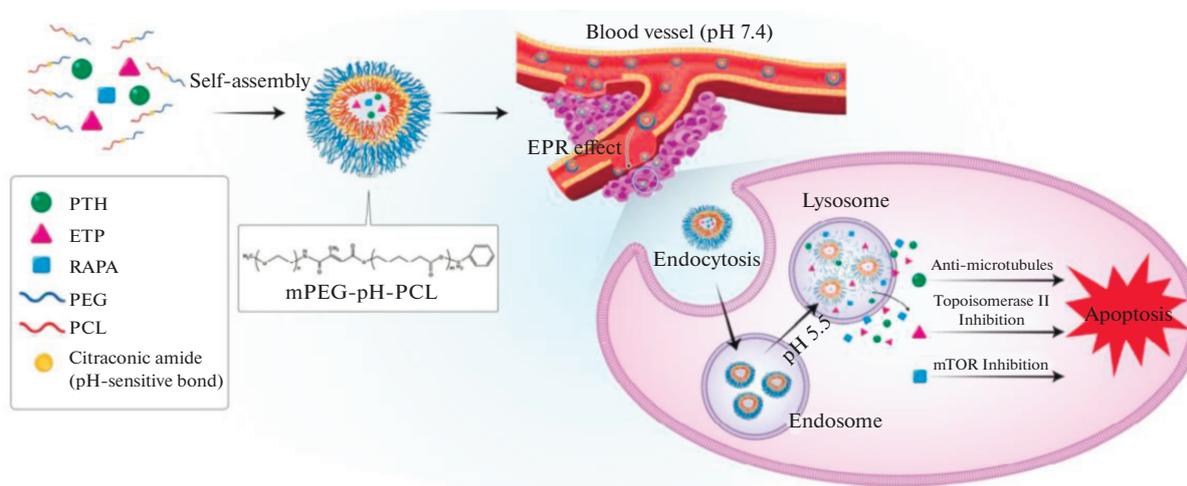


Рис. 9. Схема высвобождения этопозида (ETP), паклитаксела (PTX) и рапамицина (RAPA) из pH-чувствительных мицелл mPEG-pH-PCL в условиях *in vivo* (перепечатано из [118] с разрешения MDPI, Copyright © (2023) by the authors (CC BY 4.0 open access)).

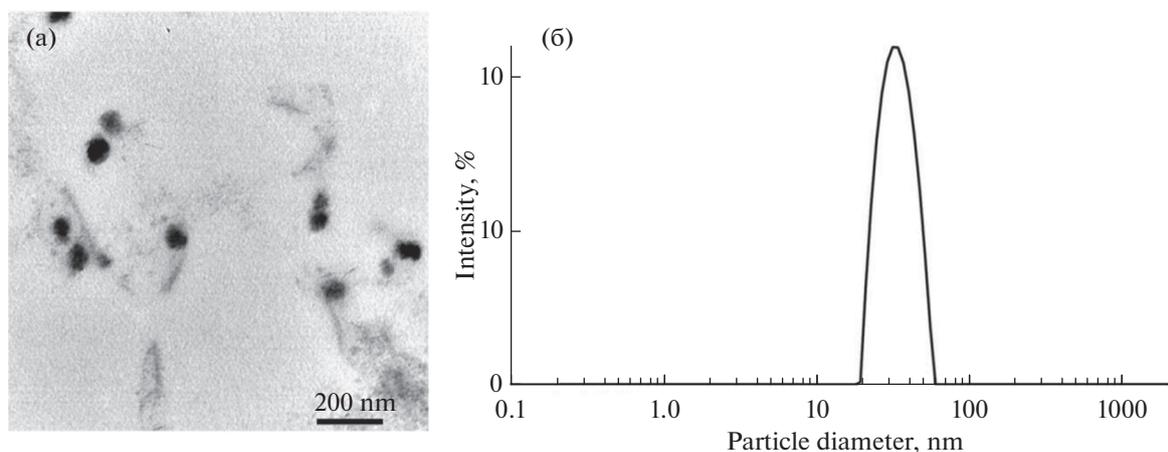


Рис. 10. (а) Микрофотография pH-чувствительных мицелл PTX/ETP/RAPA-mPEG-pH-PCL (просвечивающая электронная микроскопия, масштаб 200 нм); (б) распределение мицелл по размерам (метод динамического светорассеяния, репрезентативный график, $n = 3$) (перепечатано из [118] с разрешения MDPI, Copyright © (2023) by the authors (CC BY 4.0 open access)).

оценить вклад pH-чувствительных связей во взаимодействие мицелл с живыми объектами.

4.5. Мицеллы из биополимеров

Для получения мицелл из биополимеров используют либо их гидрофобные производные, либо полиэлектролитные комплексы.

Мицеллы из ацилированного стеариновой кислотой декстрана получали методом диализа [106, 119]. Параметры мицелл зависели от состава полимера: мольного соотношения стеарат/декстран ($S = 7.5$ или 10) и молекулярной массы декстрана ($D = 6$ или 10 кДа). Так, размеры мицелл составляли ~ 130 нм для мицелл $D_{10}S_{7.5}$ и $D_6S_{7.5}$ и 200 –

300 нм для мицелл $D_{10}S_{10}$ и D_6S_{10} соответственно. Значения ККМ также зависели от состава полимера и возрастали с ростом молекулярной массы декстрана и увеличением доли стеарата от 7.44 мг/л для $D_6S_{7.5}$ до 22.08 мг/л для $D_{10}S_{10}$. Аналогичную корреляцию наблюдали для скорости высвобождения этопозида: мицеллы $D_6S_{7.5}$ высвобождали $\sim 50\%$ этопозида в течение 10 ч, а мицеллы $D_{10}S_{10}$ – более 48 ч. Нагруженные этопозидом мицеллы $D_6S_{7.5}$ и $D_{10}S_{7.5}$ (содержание этопозида 31.7 и 18.5 , дзета-потенциал -19 и -7 мВ) проявили более высокую, чем свободный этопозида, цитотоксичность на клетках колоректальной аденокарциномы мыши СТ-26 [106]. Этот результат, объясняется, по-видимому, эффективной интернализацией

мицеллярного этопозида в клетки путем эндоцитоза.

Интересный метод получения гибридных липид-полимерных мицелл, нагруженных этопозидом, предложили Agwa и соавт. [120]. Мицеллы получали методом упаривания растворителя, добавляя раствор этопозида и витамина D3 в этаноле к водному раствору казеината натрия. Этанол упаривали и к образовавшемуся мицеллярному раствору добавляли другой мицеллярный раствор, полученный путем гидратирования пленки, состоящий из комплекса витамина D3 и фосфатидилхолина (2 : 1 моль/моль). Полученные таким образом мицеллы, содержащие этопозид и витамин D3, имели размер ~230 нм и отрицательный дзета-потенциал (-30 мВ). Высвобождение обоих компонентов было медленным (12.5 и 5.7% за 48 ч соответственно), что, возможно, объясняется стабилизацией мицелл в результате взаимодействия витамина D3 с казеином [24]. Витамин D3 в этой системе выполнял также роль вектора к рецепторам VDR (vitamin D3 receptor), который экспрессируется клетками рака молочной железы и клетками иммунной системы, а также ингредиента с собственной противоопухолевой активностью, опосредованной активацией рецептора VDR и изменениями, который VDR вносит в транскриптом иммунных и опухолевых клеток, регулируя их пролиферацию и дифференциацию [121]. Мицеллы D3/ETP, меченные родамином В, лучше накапливались в подкожно имплантированной карциноме Эрлиха и обеспечили более выраженный противоопухолевый эффект, чем комбинация свободных D3 и этопозида. Торможение роста опухоли сопровождалось повышением активности апоптоза, а также снижением активности аутофагии и ангиогенеза. Исследования на клетках опухолей молочной железы MCF-7 и MDA-MB 231 показали синергетический цитотоксический эффект комбинации D3 с этопозидом, как для свободных ЛВ, так и для мицеллярной формы.

Повышенную эффективность в отношении опухоли Эрлиха показала и еще одна интересная мицеллярная система со-доставки этопозида и транс-ретиноевой кислоты (активный метаболит витамина А, ATRA) [122]. Нагруженные обоими ЛВ мицеллы (ETP/ATRA UPM) получали из конъюгата растительного белка зеина и хондроитина сульфата методом упаривания растворителя. Для повышения стабильности мицеллы дополнительно сшивали хлоридом кальция (ETP/ATRA CPM). Действительно, сшивка мицелл значительно замедлила скорость высвобождения обоих ЛВ. Оба типа мицелл показали более выраженный противоопухолевый эффект (торможение роста опухоли) по сравнению со свободными ЛВ. Хотя показатели торможения роста опухоли для обоих типов мицелл были близкими, в группе ETP/ATRA CPM

уровень пролиферации был ниже, а площадь некрозов – больше, что указывает на более высокую активность этой системы. Хондроитин сульфат в этом исследовании мог играть роль вектора к рецепторам CD44, экспрессируемым клетками опухоли. Синергетический цитотоксический эффект ЛВ в отношении клеток MCF-7 был показан и в этом исследовании.

В завершение следует упомянуть о возможности получения мицеллярной формы ЛВ путем синтеза его амфифильного производного. Хотя, насколько нам известно, такой подход для этопозида изучен не был, в литературе описаны мицеллы из производных его близкого аналога – эпиподофиллотоксина, который также является ингибитором топоизомеразы II. В первом случае, эпиподофиллотоксин конъюгировали со стеариновой кислотой и PEG (C18-ePT-PEG) [123], во втором – со стеариновой кислотой и спермином (C18-ePT-Sper) [124]. Примечательно, что оба типа мицелл были монодисперсными и имели очень маленькие размеры – 5–8 нм; дзета-потенциал мицелл C18-ePT-PEG был почти нейтральным (+0.3 мВ), а мицелл C18-ePT-Sper – положительным (+32 мВ). Образованию мицелл могли способствовать как гидрофобные взаимодействия между липофильными фрагментами молекул, так и π - π взаимодействия между ароматическими фрагментами. По сравнению с мицеллами C18-ePT-PEG, мицеллы C18-ePT-Sper проявили значительно более высокую цитотоксичность в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека A-431, что, по-видимому, объясняется их более активным проникновением в клетку. Авторы также полагают, что присутствие фрагмента спермина в молекуле могло усилить ее связывание с ДНК, что, в свою очередь, привело к более эффективному ингибированию топоизомеразы II. Интересно, что, несмотря на маленький размер, мицеллы C18-ePT-PEG эффективно накапливались в опухоли MDA-MB-231. С технологической точки зрения, очевидными преимуществами мицелл, образованных амфифильными производными ЛВ (по сравнению с полимерными мицеллами), являются отсутствие вспомогательных веществ и монодисперсность.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всей немногочисленности исследований в области наночастиц этопозида на основе полимерных мицелл и наночастиц, рассматривая их, можно проследить основные тенденции, характерные и для систем доставки других противоопухолевых веществ: размер большинства носителей (твердотельных полимерных наночастиц и мицелл), использованных для доставки этопозида, не превышает 200 нм, при этом их поверхность имеет отрицательный дзета-потенциал (если по-

верхность не модифицирована катионными агентами). Такие носители потенциально обладают относительно низкой токсичностью и способны доставлять ЛВ в опухоль, используя эффект EPR, что мы и наблюдаем в различных исследованиях. Снижению клиренса и накопления в органах РЭС способствует также защита наночастиц от опсонизации с помощью гидрофильной оболочки (“стелс-эффект”).

Общие тенденции можно отметить и при сравнении систем доставки этопозидов на основе твердотельных наночастиц и мицелл: для получения обоих типов носителей используют только биodeградируемые полимеры синтетического или природного происхождения; для повышения селективности действия и мицеллы, и наночастицы конъюгируют с векторами; кроме того, конструируют стимул-чувствительные системы, способные реагировать на специфические условия в опухоли или ее микроокружении.

Результаты большинства исследований позволяют заключить, что коллоидные системы доставки на основе полимерных мицелл и наночастиц обладают значительным потенциалом для повышения противоопухолевого эффекта этопозидов. Следует особо отметить интерес разработчиков систем доставки этопозидов к опухолям мозга и, в частности, к глиомам. Хотя нейроонкологи отмечают высокий антиглиомный потенциал ингибиторов топоизомеразы II и, в частности, этопозидов [125, 126], в настоящее время этопозид лишь ограниченно применяется для химиотерапии глиом, поскольку его транспорту в мозг препятствует ГЭБ [127]. Этот потенциал мог бы реализоваться с помощью наноносителей, которые преодолеют ГЭБ и позволят повысить концентрации этопозидов в интракраниальной опухоли, не повышая его дозу и тем самым избегая усиления неспецифической токсичности. Хотя в литературе отсутствуют данные о применении систем доставки этопозидов при опухолях яичка, способность наночастиц переносить ЛВ через гистогематические барьеры может быть актуальна и для таких опухолей, поскольку в этом случае доступ ЛВ ограничивает гематотестикулярный барьер, во многом схожий с ГЭБ [128].

При всей их сложности системы доставки этопозидов (как и других ЛВ) представляют собой лекарственные формы, и потому их продвижение в практику требует тщательной оценки многих свойств, которые пока остаются недостаточно изученными, в том числе токсикологические характеристики и стабильность. Решение этих задач позволит полностью реализовать потенциал этопозидов и повысить эффективность химиотерапии опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AUC	площадь под фармакокинетической кривой концентрация–время (<i>англ. Area-Under-Curve</i>)
BSA	бычий сывороточный альбумин
эффект EPR	эффект, способствующий проникновению и накоплению наночастиц и макромолекул в опухоли (<i>англ. Enhanced Permeation and Retention эффект</i>)
ETP	этопозид
ETP-cbz	4'-O-бензилоксикарбонил-этопозид
HSA	человеческий сывороточный альбумин
mPEG	метиловый эфир полиэтиленгликоля
PCL	поли-ε-капролактон
PEG	полиэтиленгликоль
PLA	полимолочная кислота
PLGA	сополимер молочной и гликолевой кислот
siRNA	малая интерферирующая РНК
TPGS	D-α-токоферил полиэтиленгликоль 1000 сукцинат
ГЭБ	гематоэнцефалический барьер
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФА	диметилформамид
ЛВ	лекарственное вещество
МРЛ	мелкоклеточный рак легких
ПВС	поливиниловый спирт
ПАВ	поверхностно-активное вещество

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ, грант № 23-25-00194).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hande K.R.* Etoposide: Four decades of development of a topoisomerase II inhibitor // *European Journal of Cancer*. 1998. V. 34. № 10. P. 1514–1521. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00228-7](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00228-7)
2. Примерный перечень основных лекарственных средств, 21-й перечень, 2019 г. Копенгаген: Европейское региональное бюро ВОЗ; 2020. Лицензия: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331990/WHO-EURO-2020-476-40211-53802-rus.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
3. *Agrawal K.* Etoposide // *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007. P. 1–5. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61729-5>

4. *Slevin M.L.* The clinical pharmacology of etoposide // *Cancer*. 1991. V. 67. № S1. P. 319–329. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910101\)67:1+<319::AID-CNCR2820671319>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910101)67:1+<319::AID-CNCR2820671319>3.0.CO;2-D)
5. *Montecucco A., Zanetta F., Biamonti G.* Molecular mechanisms of etoposide // *EXCLI Journal*. Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors. 2015. V. 14. P. 95–108. <https://doi.org/10.17179/excli2014-561>
6. *Baldwin E.L., Osheroff N.* Etoposide, topoisomerase II and cancer // *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2005. V. 5. № 4. P. 363–372. <https://doi.org/10.2174/1568011054222364>
7. *Kroschinsky F.P., Friedrichsen K., Mueller J. et al.* Pharmacokinetic comparison of oral and intravenous etoposide in patients treated with the CHOEP-regimen for malignant lymphomas // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2008. V. 61. P. 785–790. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0535-3>
8. *Shah J.C., Chen J.R., Chow D.* Preformulation study of etoposide: Identification of physicochemical characteristics responsible for the low and erratic oral bioavailability of etoposide // *Pharmaceutical Research*. 1989. V. 6. P. 408–412. <https://doi.org/10.1023/A:1015935532725>
9. *Siderov J., Prasad P., De Boer R., Desai J.* Safe administration of etoposide phosphate after hypersensitivity reaction to intravenous etoposide // *British Journal of Cancer*. 2002. V. 86. № 1. P. 12–13. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600003>
10. *Hoetelmans R.M.W., Schornagel J.H., ten Bokkel Huinink W.W., Beijnen J.H.* Hypersensitivity reactions to etoposide // *Annals of Pharmacotherapy*. 1996. V. 30. № 4. P. 367–371. <https://doi.org/10.1177/106002809603000409>
11. *Bernstein B.J., Troner M.B.* Successful rechallenge with etoposide phosphate after an acute hypersensitivity reaction to etoposide // *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1999. V. 19. № 8. P. 989–991. <https://doi.org/10.1592/phco.19.11.989.31566>
12. *Zhao W.* Challenges and potential for improving the druggability of podophylloxin-derived drugs in cancer chemotherapy // *Nat. Prod. Rep.* 2021. V. 38. № 3. P. 470–488. <https://doi.org/10.1039/d0np00041h>
13. *Махачева Ф.А., Валиев Т.Т.* Особенности вторичного острого миелоидного лейкоза у детей // *Онкогематология*. 2020. Т. 15. № 4. С. 12–17. <https://doi.org/10.17650/1818-8346-2020-15-4-12-17>
14. *Zhang M., Hagan C.T., Foley H. et al.* Co-delivery of etoposide and cisplatin in dual-drug loaded nanoparticles synergistically improves chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer models // *Acta Biomaterialia*. 2021. V. 124. P. 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.02.001>
15. *Rafiyath S. M., Rasul M., Lee B., Wei G., Lamba G., Liu D.* Comparison of safety and toxicity of liposomal doxorubicin vs. conventional anthracyclines: A meta-analysis // *Exp. Hematol. Oncol.* 2012. V. 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-10>
16. *Фармакопей РФ.* Требования к показателям качества и исследованию лекарственных средств на основе липосом, мицелл и лекарственных средств, содержащих покрытия из наночастиц. https://pharmacopoeia.ru/trebovaniya-k-pokazatelyam-kachestva-i-issledovaniyu-lekarstvennyh-sredstv-na-osnove-liposom-mitsell-ilekarstvennyh-sredstv-soderzhashih-pokrytiya-iz-nanochastits/#%D0%A0%D0%90%D0%97%D0%94%D0%95%D0%9B_2_%D0%A0%D0%B0%D0%B7%D1%80%D0%B0%D0%B1%D0%BE%D1%82%D0%BA%D0%B0_%D0%BB%D0%B5%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%81%D1%82%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%BD%D1%8B%D1%85_%D0%BF%D1%80%D0%B5%D0%BF%D0%B0%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B2_%D0%BD%D0%B0_%D0%BE%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D0%B5_%D0%BC%D0%B8%D1%86%D0%B5%D0%BB_%D0%BB_%D0%B1%D0%BB%D0%BE%D0%BA-%D1%81%D0%BE%D0%BF%D0%BE%D0%BB%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D1%80%D0%BE%D0%B2 (обращение 20 июля 2022).
17. US FDA. Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials. Guidance for Industry, April 2022. <https://www.fda.gov/media/157812>.
18. *Sindhvani S., Syed, A. M., Ngai J. et al.* The entry of nanoparticles into solid tumours // *Nature Materials*. 2020. V. 19. № 5. P. 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>
19. *Malinovskaya J., Salami R., Valikhov M. et al.* Supermagnetic human serum albumin (HSA) nanoparticles and PLGA-based doxorubicin nanoformulation: A duet for selective nanotherapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 627. <https://doi.org/10.3390/ijms24010627>
20. *Yuan Z.Q., Chen W.L., You B.G. et al.* Multifunctional nanoparticles co-delivering EZH2 siRNA and etoposide for synergistic therapy of orthotopic non-small-cell lung tumor // *JCR*. 2017. V. 268. P. 198–211. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.10.025>
21. *Huang H.L., Lin W.J.* Dual peptide-modified nanoparticles improve combination chemotherapy of etoposide and siPIK3CA against drug-resistant small cell lung carcinoma // *Pharmaceutics*. 2020. V. 12. № 3. P. 254. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030254>
22. *Bai J., Tian Y., Liu F. et al.* Octreotide-conjugated core-cross-linked micelles with pH/redox responsivity loaded with etoposide for neuroendocrine neoplasms therapy and bioimaging with photoquenching resistance // *ACS Appl Mater Interface*. 2019. V. 11. № 20. P. 18111–18122. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b01827>
23. *Kuo Y.C., Chang Y.H., Rajesh R.* Targeted delivery of etoposide, carmustine and doxorubicin to human glioblastoma cells using methoxy poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin and folic acid // *Mater. Sci. Eng. C*. 2019. V. 96. P. 114–128. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.094>
24. *Cohen Y., Levi M., Lesmes U., Margier M., Reboul E., Livney Y.D.* Re-assembled casein micelles improve *in vitro* bioavailability of vitamin D in a Caco-2 cell mod-

- el // *Food & Function*. 2017. V. 8. № 6. P. 2133–2141. <https://doi.org/10.1039/c7fo00323d>
25. *Naumenko V.A., Vlasova K.Y., Garanina A.S. et al.* Extravasating neutrophils open vascular barrier and improve liposomes delivery to tumors // *ACS Nano*. 2019. V. 13. № 11. P. 12599–12612. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b03848>
 26. *Lin Q., Fathi P., Chen X.* Nanoparticle delivery *in vivo*: A fresh look from intravital imaging // *EBioMedicine*. 2020. V. 59. P. 102958. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102958>
 27. *Golombek S.K. et al.* Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2018. V. 130. P. 17–38. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.007>
 28. *Kakkar A., Traverso G., Farokhzad O.C., Weissleder R., Langer R.* Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems // *Nat. Rev. Chem*. 2017. V. 1. № 8. P. 0063. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0063>
 29. *Mitchell M.J., Billingsley M.M., Haley R.M. et al.* Engineering precision nanoparticles for drug delivery // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2021. V. 20. № 2. P. 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
 30. *Takechi-Haraya Y., Ohgita T., Demizu Y., Saito H., Izutsu K.I., Sakai-Kato K.* Current status and challenges of analytical methods for evaluation of size and surface modification of nanoparticle-based drug formulations // *AAPS PharmSciTech*. 2022. V. 23. № 5. P. 150. <https://doi.org/10.1208/s12249-022-02303-y>
 31. *Nel A.E., Madler L., Velegol D. et al.* Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface // *Nature Materials*. 2009. V. 8. № 7. P. 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>
 32. *Skalickova S., Nejdil L., Kudr J. et al.* Fluorescence characterization of gold modified liposomes with anti-sense N-myc DNA bound to the magnetisable particles with encapsulated anticancer drugs (doxorubicin, ellipticine and etoposide) // *Sensors*. 2016. V. 16. № 3. P. 290. <https://doi.org/10.3390/s16030290>
 33. *Mehrabi M., Esmailpour P., Akbarzadeh A. et al.* Efficacy of pegylated liposomal etoposide nanoparticles on breast cancer cell lines // *Turk. J. Med. Sci*. 2016. V. 46. № 2. P. 567–571. <https://doi.org/10.3906/sag-1412-67>
 34. *Deng W., Chen W., Clement S. et al.* Controlled gene and drug release from a liposomal delivery platform triggered by X-ray radiation // *Nat. Commun*. 2018. V. 9. № 1. P. 2713. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05118-3>
 35. *Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi-Aliabadi H., Firozian F.* Uptake of etoposide in CT-26 cells of colorectal cancer using folate targeted dextran stearate polymeric micelles // *Biomed. Res. Int*. 2014. V. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/708593>
 36. *Qian W.Y., Sun D. M., Zhu R.R. et al.* pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release // *Int. J. Nanomedicine*. 2012. P. 5781–5792. <https://doi.org/10.2147/IJN.S34773>
 37. *Zhu R., Wang Q., Zhu Y. et al.* pH sensitive nano layered double hydroxides reduce the hematotoxicity and enhance the anticancer efficacy of etoposide on non-small cell lung cancer // *Acta Biomaterialia*. 2016. V. 29. P. 320–332. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.029>
 38. *Snehalatha M., Venugopal K., Saha R.N.* Etoposide-loaded PLGA and PCL nanoparticles I: Preparation and effect of formulation variables // *Drug Delivery*. 2008. V. 15. № 5. P. 267–275. <https://doi.org/10.1080/10717540802174662>
 39. *Yadav K.S., Chuttani K., Mishra A.K. et al.* Long circulating nanoparticles of etoposide using PLGA-MPEG and PLGA-pluronic block copolymers: Characterization, drug-release, blood-clearance, and biodistribution studies // *Drug Dev. Res*. 2010. V. 71. № 4. P. 228–239. <https://doi.org/10.1002/ddr.20365>
 40. *Yadav K.S., Sawant K.K.* Formulation optimization of etoposide loaded PLGA nanoparticles by double factorial design and their evaluation // *Curr. Drug Deliv*. 2010. V. 7. № 1. P. 51–64. <https://doi.org/10.2174/156720110790396517>
 41. *Wang Z., Li Z., Zhang D. et al.* Development of etoposide-loaded bovine serum albumin nanosuspensions for parenteral delivery // *Drug Delivery*. 2015. V. 22. № 1. P. 79–85. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.871600>
 42. *Kuo Y.C., Lee C.H.* Inhibition against growth of glioblastoma multiforme *in vitro* using etoposide-loaded solid lipid nanoparticles with p -aminophenyl- α -D-manno-pyranoside and folic acid // *J. Pharm. Sci*. 2015. V. 104. № 5. P. 1804–1814. <https://doi.org/10.1002/jps.24388>
 43. *Kuo Y.C., Wang I.H.* Enhanced delivery of etoposide across the blood–brain barrier to restrain brain tumor growth using melanotransferrin antibody-and tamoxifen-conjugated solid lipid nanoparticles // *J. Drug Target*. 2016. V. 24. № 7. P. 645–654. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1132223>
 44. *Jin G.W., Rejinold N.S., Choy J.H.* Multifunctional polymeric micelles for cancer therapy // *Polymers*. 2022. V. 14. № 22. P. 4839. <https://doi.org/10.3390/polym14224839>
 45. *Ahmad I., Pandit J., Sultana Y. et al.* Optimization by design of etoposide loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Characterization, pharmacokinetic and deposition study // *Mater. Sci. Eng. C*. 2019. V. 100. P. 959–970. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.060>
 46. *Zhu Y., Zhu R., Wang M. et al.* Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of core–shell SiO_2 @LDH loaded with etoposide in non-small cell lung cancer // *Advanced Science*. 2016. V. 3. № 11. P. 1600229. <https://doi.org/10.1002/advs.201600229>
 47. *Jo M.J., Shin H.J., Yoon M.S. et al.* Evaluation of pH-sensitive polymeric micelles using citraconic amide bonds for the co-delivery of paclitaxel, etoposide, and rapamycin // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 1. P. 154. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010154>
 48. *Abdel-Bar H.M., Walters A.A., Wang J.T.W., Al-Jamal K.T.* Combinatory delivery of etoposide and siCD47 in a lipid polymer hybrid delays lung tumor growth in an experimental melanoma lung metastatic model // *Adv.*

- Healthc. Mater. 2021. V. 10. № 7. P. 2001853.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202001853>
49. Maleki H., Naghibzadeh M., Amani A. et al. Preparation of paclitaxel and etoposide co-loaded MPEG-PLGA nanoparticles: An investigation with artificial neural network // J. Pharm. Innov. 2021. V. 16. P. 11–25.
<https://doi.org/10.1007/s12247-019-09419-y>
50. Maleki H., Najafabadi M.R.H., Webster T.J. et al. Effect of Paclitaxel/etoposide co-loaded polymeric nanoparticles on tumor size and survival rate in a rat model of glioblastoma // Int. J. Pharm. 2021. V. 604. P. 120722.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120722>
51. Kovshova T., Mantrov S., Boiko S. et al. Co-delivery of paclitaxel and etoposide prodrug by human serum albumin and PLGA nanoparticles: Synergistic cytotoxicity in brain tumour cells // J. Microencapsul. 2023. V. 40. № 4. P. 246–262.
<https://doi.org/10.1080/02652048.2023.2188943>
52. Lim C., Ramsey J.D., Hwang D. et al. Drug-dependent morphological transitions in spherical and worm-like polymeric micelles define stability and pharmacological performance of micellar drugs // Small. 2022. V. 18. № 4. P. 2103552.
<https://doi.org/10.1002/smll.202103552>
53. Rezyantalab S., Drude N.I., Moraveji M.K. et al. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment // Front. Pharmacol. 2018. V. 9. P. 1260.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01260>
54. Casalini T., Rossi F., Castrovinci A., Perale G. A Perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. V. 7. P. 259.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00259>
55. Operti M.C., Bernhardt A., Grimm S. et al. PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up // Int. J. Pharm. 2021. V. 605. P. 120807.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120807>
56. Park K., Otte A., Sharifi F. et al. Formulation composition, manufacturing process, and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles // Journal of Controlled Release. 2021. V. 329. P. 1150–1161.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.044>
57. Callewaert M., Dukic S., Van Gulick L. et al. Etoposide encapsulation in surface-modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumor efficiency // J. Biomed. Mater. Res. A. 2013. V. 101 A. № 5. P. 1319–1327.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.34442>
58. Saadati R., Dadashzadeh S. Marked effects of combined TPGS and PVA emulsifiers in the fabrication of etoposide-loaded PLGA-PEG nanoparticles: *In vitro* and *in vivo* evaluation // Int. J. Pharm. 2014. V. 464. № 1–2. P. 135–144.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.01.014>
59. Yadav K.S., Jacob S., Sachdeva G., Sawant K.K. Intracellular delivery of etoposide loaded biodegradable nanoparticles: Cytotoxicity and cellular uptake studies // J. Nanosci. Nanotechnol. 2011. V. 11. № 8. P. 6657–6667.
<https://doi.org/10.1166/jnn.2011.4225>
60. Rivas C.J.M., Tarhini M., Badri W. et al. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery // Int. J. Pharm. 2017. V. 532. № 1. P. 66–81.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
61. Callewaert M., Dukic S., Van Gulick L. et al. Etoposide encapsulation in surface-modified poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles strongly enhances glioma antitumor efficiency // J. Biomed. Mater. Res. A. 2013. V. 101. № 5. P. 1319–1327.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.34442>
62. Kovshova T., Osipova N., Alekseeva A. et al. Exploring the interplay between drug release and targeting of lipid-like polymer nanoparticles loaded with doxorubicin // Molecules. 2021. V. 26. № 4. P. 831.
<https://doi.org/10.3390/molecules26040831>
63. Stipa P., Marano S., Galeazzi R. et al. Prediction of drug-carrier interactions of PLA and PLGA drug-loaded nanoparticles by molecular dynamics simulations // Eur. Polym. J. 2021. V. 147. P. 110292.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110292>
64. Ермоленко Ю.В., Семёнкин А.С., Ульянова Ю.В., Ковшова Т.С., Максименко О.О., Гельперина С.Э. Роль гидролитической деградации полилактидных носителей при разработке нано- и микроразмерных лекарственных форм на их основе // Известия Академии наук. Серия химическая. 2020. Т. 8. С. 1416–1427.
65. D'Souza S.A. Review of *in vitro* drug release test methods for nano-sized dosage forms // Advances in pharmaceuticals. 2014. V. 2014. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2014/304757>
66. Pimple S., Manjappa A.S., Ukawala M., Murthy R.S.R. PLGA nanoparticles loaded with etoposide and quercetin dihydrate individually: *In vitro* cell line study to ensure advantage of combination therapy // Cancer Nanotechnol. 2012. V. 3. P. 25–36.
<https://doi.org/10.1007/s12645-012-0027-y>
67. Yadav R., Kumar D., Kumari A. et al. Encapsulation of podophyllotoxin and etoposide in biodegradable poly-D,L-lactide nanoparticles improved their anticancer activity // J. Microencapsul. 2014. V. 31. № 3. P. 211–219.
<https://doi.org/10.3109/02652048.2013.834988>
68. Singh V., Sahebkar A., Kesharwani P. Poly (propylene imine) dendrimer as an emerging polymeric nanocarrier for anticancer drug and gene delivery // Eur. Polym. J. 2021. V. 158. P. 110683.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110683>
69. Посыпанова Г.А., Горшкова Л.Б., Родина А.В. и др. Характеристика противоопухолевой активности полимерной формы этопозида в составе биодеградируемого сополимера молочной и гликолевой кислот // Химико-фармацевтический журнал. 2016. P. 45–49.
70. Mitra M., Dilnawaz F., Misra R. et al. Toxicogenomics of nanoparticulate delivery of etoposide: Potential impact on nanotechnology in retinoblastoma therapy // Cancer Nanotechnol. 2011. V. 2. № 1–6. P. 21–36.
<https://doi.org/10.1007/s12645-010-0010-4>
71. Schaefer M.J., Singh J. Effect of tricaprin on the physical characteristics and *in vitro* release of etoposide from PLGA microspheres // Biomaterials. 2002. V. 23. № 16. P. 3465–3471.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00053-4)

72. *Moghimi S.M., Hunter A.C., Andresen T.L.* Factors controlling nanoparticle pharmacokinetics: an integrated analysis and perspective // *Annu. Rev. Pharmacol.* 2012. V. 52. P. 481–503.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134623>
73. *Yadav K.S., Chuttani K., Mishra A.K., Sawant K.K.* Effect of size on the biodistribution and blood clearance of etoposide-loaded PLGA nanoparticles // *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2011. V. 65. № 2. P. 131–139.
74. *Snehalatha M., Kolachina V., Saha R.N. et al.* Enhanced tumor uptake, biodistribution and pharmacokinetics of etoposide loaded nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice // *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2013. V. 5. № 4. P. 290–297.
<https://doi.org/10.4103/0975-7406.120081>
75. *Sarfarazi A., Lee G., Mirjalili S.A. et al.* Therapeutic delivery to the peritoneal lymphatics: Treatment benefits and future prospects // *Int. J. Pharm.* 2019. V. 567. P. 118456.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118456>
76. *Lee G., Han S., Inocencio I., Cao E. et al.* Lymphatic uptake of liposomes after intraperitoneal administration primarily occurs via the diaphragmatic lymphatics and is dependent on liposome surface properties // *Mol. Pharm.* 2019. V. 16. № 12. P. 4987–4999.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00855>
77. *Malinovskaya Y., Melnikov P., Baklaushev V. et al.* Delivery of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles into U87 human glioblastoma cells // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 524. № 1–2. P. 77–90.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.03.049>
78. *Kuo Y.C., Chen Y.C.* Targeting delivery of etoposide to inhibit the growth of human glioblastoma multiforme using lactoferrin- and folic acid-grafted poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles // *Int. J. Pharm.* 2015. V. 479. № 1. P. 138–149.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.070>
79. *Lagas J.S., Fan L., Wagenaar E. et al.* P-Glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 1. P. 130–140.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1321>
80. *Kuplennik N., Lang K., Steinfeld R., Sosnik A.* Folate receptor α -modified nanoparticles for targeting of the central nervous system // *ACS Appl. Mater. Interface.* 2019. V. 11. № 43. P. 39633–39647.
<https://doi.org/10.1021/acsami.9b14659>
81. *Godse R., Rathod M., De A., Shinde U.* Intravitreal galactose conjugated polymeric nanoparticles of etoposide for retinoblastoma // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2021. V. 61. P. 102259.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102259>
82. *Pan J., Rostamizadeh K., Filipczak N., Torchilin V.P.* Polymeric co-delivery systems in cancer treatment: An overview on component drugs' dosage ratio effect // *Molecules.* 2019. V. 24. № 6. P. 1035.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061035>
83. *Fatma S., Talegaonkar S., Iqbal Z. et al.* Novel flavonoid-based biodegradable nanoparticles for effective oral delivery of etoposide by P-glycoprotein modulation: An *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* investigations // *Drug Delivery.* 2016. V. 23. № 2. P. 500–511.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2014.923956>
84. *Espinoza S.M., Patil H.I., San Martin Martinez E., Casañas Pimentel R., Ige P.P.* Poly- ϵ -caprolactone (PCL), a promising polymer for pharmaceutical and biomedical applications: Focus on nanomedicine in cancer // *Int. J. Polym. Mater.* 2020. V. 69. № 2. P. 85–126.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2018.1539990>
85. *Kalita N.K., Bhasney S.M., Mudenur C. et al.* End-of-life evaluation and biodegradation of poly(lactic acid)(PLA)/polycaprolactone (PCL)/microcrystalline cellulose (MCC) polyblends under composting conditions // *Chemosphere.* 2020. V. 247. P. 125875.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125875>
86. *Vivek K., Harivardhan Reddy L., Murthy R.S.R.* Comparative study of some biodegradable polymers on the entrapment efficiency and release behavior of etoposide from microspheres // *Pharm. Dev. Technol.* 2007. V. 12. № 1. P. 79–88.
<https://doi.org/10.1080/10837450601168581>
87. *Kuo Y.C., Wang I.H.* Using cationic solid lipid nanoparticles with wheat germ agglutinin and lactoferrin for targeted delivery of etoposide to glioblastoma multiforme // *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 2017. V. 77. P. 73–82.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.05.003>
88. *Xu Y., Tang L., Liu Y. et al.* Dual-modified albumin-polymer nanocomplexes with enhanced *in vivo* stability for hepatocellular carcinoma therapy // *Colloids Surf. B.* 2021. V. 201. P. 111642.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111642>
89. *Xie P., Yan J., Wu M. et al.* CD44 potentiates hepatocellular carcinoma migration and extrahepatic metastases via the AKT/ERK signaling CXCR4 axis // *Annals of Translational Medicine.* 2022. V. 10. № 12. P. 689.
<https://doi.org/10.21037/atm-22-2482>
90. *Spada A., Emami J., Tuszyński J.A., Lavasanifar A.* The uniqueness of albumin as a carrier in nanodrug delivery // *Mol. Pharm.* 2021. V. 18. № 5. P. 1862–1894.
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046>
91. *Manjushree M., Revanasiddappa H.D.* Evaluation of binding mode between anticancer drug etoposide and human serum albumin by numerous spectrometric techniques and molecular docking // *Chemical Physics.* 2020. V. 530. P. 110593.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.110593>
92. *Akdogan Y., Reichenwallner J., Hinderberger D.* Evidence for water-tuned structural differences in proteins: An approach emphasizing variations in local hydrophilicity // *PLOS One.* 2012. V. 7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045681>
93. *Osipova N., Budko A., Maksimenko O. et al.* Comparison of compartmental and non-compartmental analysis to detect biopharmaceutical similarity of intravenous nanomaterial-based rifabutin formulations // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. № 4. P. 1258.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041258>
94. *Elgohary M.M., Helmy M.W., Mortada S.M., Elzoghby A.O.* Dual-targeted nano-in-nano albumin carriers enhance the efficacy of combined chemo/herbal therapy of lung cancer // *Nanomedicine.* 2018. V. 13.

- № 17. P. 2221–2224.
<https://doi.org/10.2217/nmm-2018-0097>
95. Narayana R.V.L., Jana P., Tomar N. et al. Carboplatin- and etoposide-loaded lactoferrin protein nanoparticles for targeting cancer stem cells in retinoblastoma *in vitro* // *IOVS*. 2021. V. 62. № 14. P. 13.
<https://doi.org/10.1167/iovs.62.14.13>
 96. Akbal Ö., Erdal E., Vural T. et al. Comparison of protein- and polysaccharide-based nanoparticles for cancer therapy: Synthesis, characterization, drug release, and interaction with a breast cancer cell line // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2017. V. 45. № 2. P. 193–203.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1170694>
 97. Raval N., Maheshwari R., Shukla H. et al. Multifunctional polymeric micellar nanomedicine in the diagnosis and treatment of cancer // *Mater. Sci. Eng. C*. 2021. V. 126. P. 112186.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112186>
 98. Hwang D., Ramsey J.D., Kabanov A.V. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2020. V. 156. P. 80–118.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.09.009>
 99. Mohanty A.K., Dilnawaz F., Mohanty C., Sahoo S.K. Etoposide-loaded biodegradable amphiphilic methoxy (poly ethylene glycol) and poly (epsilon caprolactone) copolymeric micelles as drug delivery vehicle for cancer therapy // *Drug Delivery*. 2010. V. 17. № 5. P. 330–342.
<https://doi.org/10.3109/10717541003720688>
 100. Letchford K., Liggins R., Burt H. Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations // *J. Pharm. Sci.* 2008. V. 97. № 3. P. 1179–1190.
<https://doi.org/10.1002/jps.21037>
 101. Chen L., Tan L., Zhang X. et al. Which polymer is more suitable for etoposide: A comparison between two kinds of drug loaded polymeric micelles *in vitro* and *in vivo*? // *Int. J. Pharm.* 2015. V. 495. № 1. P. 265–275.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.043>
 102. Ukawala M., Rajyaguru T., Chaudhari K. et al. Investigation on design of stable etoposide-loaded PEG-PCL micelles: Effect of molecular weight of PEG-PCL diblock copolymer on the *in vitro* and *in vivo* performance of micelles // *Drug Delivery*. 2012. V. 19 № 3. P. 155–167.
<https://doi.org/10.3109/10717544.2012.657721>
 103. Shin H.C., Alani A.W., Rao D.A., Rockich N.C., Kwon G.S. Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs // *J. Control Release*. 2009. V. 140. № 3. P. 294–300.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa66ba>
 104. Tsend-Ayush A., Zhu X., Ding Y., Yao J., Yin L., Zhou J., Yao J. Lactobionic acid-conjugated TPGS nanoparticles for enhancing therapeutic efficacy of etoposide against hepatocellular carcinoma // *Nanotechnology*. 2017. V. 28. № 19. P. 195602.
<https://doi.org/10.1088/1361-6528/aa66ba>
 105. Zhu X., Tsend-Ayush A., Yuan Z. et al. Glycyrhretinic acid-modified TPGS polymeric micelles for hepatocellular carcinoma-targeted therapy // *Int. J. Pharm.* 2017. V. 529. № 1–2. P. 451–464.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.011>
 106. Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi H., Firozian F., Mirian M. Optimization of self-assembling properties of fatty acids grafted to methoxy poly(ethylene glycol) as nanocarriers for etoposide // *Acta Pharm.* 2012. V. 62. № 1. P. 31–44.
<https://doi.org/10.2478/v10007-012-0006-1>
 107. Mudhakir D., Sukmadjaja S.A., Yeyet C.S. Packaging the alkaloids of cinchona bark in combination with etoposide in polymeric micelles nanoparticles // *Int. J. Pharm. Sci.* 2012. V. 6. № 12. P. 685–689.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1327853>
 108. Na H.S., Lim Y.K., Jeong Y.I., Lee H.S., Lim Y.J., Kang M.S., Cho C.S., Lee H.C. Combination antitumor effects of micelle-loaded anticancer drugs in a CT-26 murine colorectal carcinoma model // *Int. J. Pharm.* 2010. V. 383. № 1–2. P. 192–200.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.041>
 109. Lim C., Dismuke T., Malawsky D. et al. Enhancing CDK4/6 inhibitor therapy for medulloblastoma using nanoparticle delivery and scRNA-seq-guided combination with sapanisertib // *Sci. Adv.* 2022. V. 8. № 4. P. eab15838.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.ab15838>
 110. Wan X., Min Y., Bludau H., Keith A., Sheiko S.S., Jordan R., Wang A.Z., Sokolsky-Papkov M., Kabanov A.V. Drug combination synergy in worm-like polymeric micelles improves treatment outcome for small cell and non-small cell lung cancer // *ACS Nano*. 2018. V. 12. № 3. P. 2426–2439.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.7b07878>
 111. Kim J.-H., Emoto K., Iijima M., Nagasaki Y., Aoyagi T., Okano T., Sakurai Y., Kataoka K. Core-stabilized polymeric micelle as potential drug carrier: Increased solubilization of taxol // *Polym. Adv. Technol.* 1999. V. 10. № 11. P. 647–654.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1581\(199911\)10:11<647::AID-PAT918>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1581(199911)10:11<647::AID-PAT918>3.0.CO;2-Y)
 112. Wang F., Bronich T.K., Kabanov A.V., Rauh R.D., Roovers J. Synthesis and evaluation of a star amphiphilic block copolymer from poly(epsilon-caprolactone) and poly(ethylene glycol) as a potential drug delivery carrier // *Bioconjug. Chem.* 2005. V. 16. № 2. P. 397–405.
<https://doi.org/10.1021/bc049784m>
 113. Wang F., Bronich T.K., Kabanov A.V., Rauh R.D., Roovers J. Synthesis and characterization of star poly(epsilon-caprolactone)-b-poly(ethylene glycol) and poly(L-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymers: Evaluation as drug delivery carriers // *Bioconjug. Chem.* 2008. V. 19. № 7. P. 1423–1429.
<https://doi.org/10.1021/bc7004285>
 114. Ukawala M., Rajyaguru T., Chaudhari K., Manjappa A.S., Murthy R.S.R., Gude R. EILDV-conjugated, etoposide-loaded biodegradable polymeric micelles directing to tumor metastatic cells overexpressing $\alpha 4\beta 1$ integrin // *Cancer Nanotechnology*. 2011. V. 2. P. 133–145.
<https://doi.org/10.1007/s12645-011-0023-7>
 115. Luiz M.T., Di Filippo L.D., Alves R.C. et al. The use of TPGS in drug delivery systems to overcome biological

- barriers // *Eur. Polym. J.* 2021. V. 142. P. 110129. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110129>
116. *Lagarigue P., Moncalvo F., Cellesi F.* Non-spherical polymeric nanocarriers for therapeutics: The effect of shape on biological systems and drug delivery properties // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 1. P. 32. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010032>
117. *Kennedy L., Sandhu J.K., Harper M.E., Cuperlovic-Culf M.* Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 10. P. 1429. <https://doi.org/10.3390/biom10101429>
118. *Jo M.J., Shin H.J., Yoon M.S. et al.* Evaluation of pH-sensitive polymeric micelles using citraconic amide bonds for the co-delivery of paclitaxel, etoposide, and rapamycin // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 1. P. 154. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010154>
119. *Varshosaz J., Hassanzadeh F., Sadeghi H., Firozian F., Mirian M.* Effect of molecular weight and molar ratio of dextran on self-assembly of dextran stearate polymeric micelles as nanocarriers for etoposide // *J. Nanomater.* 2012. V. 2012. P. 120. <https://doi.org/10.1155/2012/265657>
120. *Agwa M.M., Abu-Serie M.M., Abdelmonsif D.A., Mousa N., Elsayed H., Khattab S.N., Sabra S.* Vitamin D3/phospholipid complex decorated caseinate nanomicelles for targeted delivery of synergistic combination therapy in breast cancer // *Int. J. Pharm.* 2021. V. 607. P. 120965. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120965>
121. *Carlberg C., Muñoz A.* An update on vitamin D signaling and cancer // *Seminars in Cancer Biology*. 2022. V. 79. P. 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.05.018>
122. *Gaber M., Elhasany K.A. et al.* Co-administration of tretinoin enhances the anti-cancer efficacy of etoposide via tumor-targeted green nano-micelles // *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 2020. V. 192. P. 110997. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110997>
123. *Alliot J., Theodorou I., Nguyen D.V., Forier C., Ducongé F., Grave E., Doris E.* Tumor targeted micellar nanocarriers assembled from epipodophyllotoxin-based amphiphiles // *Nanoscale*. 2019. V. 11. № 19. P. 9756–9759. <https://doi.org/10.1039/C9NR01068H>
124. *Alliot J., Theodorou I., Ducongé F., Gravel E., Doris E.* Polyamine transport system-targeted nanometric micelles assembled from epipodophyllotoxin amphiphiles // *Chemical Communications*. 2019. V. 55. № 99. P. 14968–14971. <https://doi.org/10.1039/c9cc07883e>
125. *Leonard A., Wolff J.E.* Etoposide improves survival in high-grade glioma: A meta-analysis // *Anticancer Research*. 2013. V. 33. № 8. P. 3307–3315.
126. *Mehta A., Awah C.U., Sonabend A.M.* Topoisomerase II poisons for glioblastoma; Existing challenges and opportunities to personalize therapy // *Frontiers in Neurology*. 2018. V. 9. P. 459. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00459>
127. *Lagas J.S., Fan L., Wagenaar E., Vlaming M.L., van Tellingen O., Beijnen J.H., Schinkel A.H.* P-Glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 1. P. 130–140. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1321>
128. *Bart J., Groen H.J., van der Graaf W.T., Hollema H., Hendrikse N.H., Vaalburg W., Sleijfer D.T., de Vries E.G.* An oncological view on the blood–testis barrier // *The Lancet Oncology*. 2002. V. 3. № 6. P. 357–363. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(02\)00776-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(02)00776-3)