

на правах рукописи

Зернов Антон Лаврентиевич

**МИКРОЧАСТИЦЫ ИЗ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ ДЛЯ
ПРОЛОНГИРОВАННОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ БЕЛКОВ**

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской Академии Наук, Института биохимии им. А.Н.Баха РАН и на кафедре биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель:

Бонарцев Антон Павлович

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова .

Научный консультант

Бонарцева Гарина Александровна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им.
А.Н.Баха, лаборатория биохимии азотфиксации и
метаболизма азота.

Официальные оппоненты:

Сербин Александр Владимирович

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева
РАН, лаборатория химии полиэлектролитов и медико-
биологических полимеров.

Пантелеев Андрей Александрович

кандидат биологических наук, Начальник лаборатории
тканевой инженерии, Курчатовский комплекс НБИКС
технологий, НИЦ Курчатовский Институт.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Защита состоится 25 апреля 2017 г. в 15.30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел.8(495)939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ и на сайте биологического факультета МГУ <http://www.bio.msu.ru/>.

Автореферат разослан «__»_____ 2017 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



к.б.н. Пискункова Нина Федоровна.

Актуальность проблемы. В настоящее время разработка и исследование полимерных систем пролонгированного высвобождения биологически активных молекул является одной из важнейших задач современной биотехнологии и фармакологии. Действительно, применение таких систем позволяет нивелировать недостатки традиционных лекарственных форм медицинских препаратов, а именно: высокую токсичность, нестабильность и неэффективный расход действующего начала, сложность введения и другие. Среди таких систем следует отметить микрочастицы, загруженные низкомолекулярными веществами (цитостатиками, противовоспалительными средствами, антибиотиками), макромолекулами, такими как белки, а так же неорганическими наночастицами. Широкое внедрение в последнее десятилетие в медицинскую практику препаратов терапевтических белков (гормонов, цитокинов, факторов роста, моноклональных антител и др.) делает разработку систем контролируемого высвобождения именно белков особенно актуальным.

Одним из перспективных подходов для создания систем доставки белков является использование в качестве материала для создания таких систем полимеров, растворимых в органических растворителях, связывающих белковые макромолекулы лишь физически, исключая при этом химические контакты с ними. Это с одной стороны позволяет добиваться высвобождения белков из таких гетерогенных систем с заданной кинетикой высвобождения, а с другой исключает такое негативное воздействие на нативную структуру белка со стороны полимерного носителя, как образование химических связей с носителем и другие причины, приводящее к инаktivации белка. Однако создание таких систем является сложной и нетривиальной задачей. Основная проблема состоит в том, что белок может денатурировать и необратимо адсорбироваться на полимерный матрикс в процессе создания таких структур, а также при диффузии макромолекул сквозь него, при этом потеряв свою активность. Для решения этой проблемы необходимо снижение гидрофобности материала различными методами, например путем сополимеризации с более гидрофильными полимерами, либо снижением молекулярной массы полимера, что положительно сказывается на стабильности инкапсулированных белков.

Поли(3-гидроксibuтират) (ПГБ) и его сополимеры, получаемые биотехнологическим путем и являющиеся биосовместимыми и биodeградируемыми полимерами, привлекают большое внимание как перспективный материал-носитель для создания таких систем. Микробиологический синтез полимера с помощью штамма сверхпродуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б позволяет, с одной стороны, получать полимеры различной молекулярной массы, а с другой вводить в полимерную цепь различные молекулы и получать при этом сополимеры, варьируя при этом физико-химические свойства материала в широких пределах. Такая вариabельность свойств особенно важна при создании систем с заданными характеристиками высвобождения, предназначенных для доставки биологически активных веществ нужным образом (равномерно или же с первоначальным взрывным высвобождением и последующей поддерживающей терапией) и в необходимых количествах.

Также следует отметить, что создание таких систем рационально проводить с использованием хорошо охарактеризованных относительно стабильных и доступных в большом количестве модельных белков, которые, тем не менее, являются типичными представителями целых классов терапевтических белков.

Таким образом, **целью работы** явилось создание системы пролонгированного высвобождения белков на основе микрочастиц из полиоксиалканоатов.

В соответствии с целью были сформулированы следующие **задачи**:

1. Биосинтез полимеров – поли(3-гидроксibuтирата) различной молекулярной массы и его сополимера с поли(этилен гликолем) для создания систем пролонгированного высвобождения белков;
2. Разработка методики инкапсулирования белков, сывороточного альбумина и лизоцима, в микрочастицы на основе полученных полиоксиалканоатов и ее модификация для улучшения эффективности инкапсулирования белка в получаемые микрочастицы;
3. Исследование морфологии, физико-химических свойств, а так же механизмов включения и высвобождения белков из полученных структур;
4. Исследование стабильности высвобождающегося белка;
5. Исследование биосовместимости полученных микрочастиц *in vitro*.

Научная новизна. В данной работе был разработан ряд оригинальных методик инкапсулирования белков в полимерные микрочастицы на основе поли(3-гидроксибутирата) и его сополимеров. При этом модельный белок лизоцим включался в полимерную матрицу в составе композита с гидроксиапатитом. Впервые для инкапсулирования белков использован биосинтетический сополимер поли(3-гидроксibuтирата) с поли(этилен гликолем) (ПГБ-ПЭГ), а также показано, что микрочастицы из сополимера обладают лучшими параметрами инкапсулирования модельного белка лизоцима. Также впервые показано, что сополимеризация ПГБ с ПЭГ обеспечивает большую стабильность высвобождаемого белка по сравнению с гомополимером на протяжении двух недель высвобождения *in vitro*. Для частиц на основе ПГБ-ПЭГ, загруженных модельным белком лизоцимом показана высокая степень биосовместимости *in vitro* на мезенхимальных стволовых клетках крысы.

Практическая значимость работы. Проведено исследование новой полимерной системы доставки белков на основе микрочастиц из полиоксиалканоатов, пригодных для медицинского применения. В качестве модельного белка был выбран лизоцим, обладающий сходным физико-химическими свойствами с белковыми факторами роста и цитокинами, используемыми в тканевой инженерии, в частности в инженерии костной ткани. Для систем пролонгированного высвобождения белков в тканевой инженерии основной проблемой является низкая стабильность инкапсулированного вещества – белок может денатурировать, став неактивным, а также вызывать иммунную реакцию. При помощи биополимерных микрочастиц в данной работе удалось достичь пролонгированного высвобождения модельного белка в нативной форме на протяжении 14 суток. Полученные микрочастицы продемонстрировали хорошую биосовместимость и могут быть использованы в качестве систем доставки ростовых факторов и цитокинов в тканевой инженерии.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы были доложены на международной конференции по биоинформатике и биомедицинской инженерии (Испания, Гранада, 2014), XIII Российско-Китайского Симпозиума «Новые материалы и технологии» (Россия, Казань, 2015 г.). 38м конгрессе Европейского биохимического общества (Россия, Санкт-Петербург, 2013г.), XVIII, XIX и XX международном молодежном форуме «Ломоносов» (Россия, Москва, 2011, 2012, 2013гг.), первой и второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Россия, Санкт-Петербург, 2010, 2011 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах их перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, 4 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, 3 статьи в сборниках статей по материалам конференций (2 отечественные и одна зарубежная), отражающие основной объем диссертационной работы. Результаты работы также были представлены на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 159 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы, содержащий ссылки на 277 источников. Диссертация иллюстрирована 59 рисунками, содержит 6 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПГБ и сополимер ПГБ-ПЭГ.

Синтез гомополимера поли(3-гидроксibuтирата) различной молекулярной массы, а также сополимера поли(3-гидроксibuтират)-со-поли(этилен гликоль). В данной работе использовался ПГБ различной молекулярной массы (ММ): 826, 255 и 25 кДа. Полимер получали микробиологическим путем с использованием штамма-продуцента ПГБ *Azotobacter chroococcum* 7Б, в случае низкомолекулярного гомополимера синтезированный ПГБ в виде хлороформенного раствора подвергался кислому гидролизу с использованием соляной кислоты в качестве гидролитического агента. Штамм-продуцент *A. chroococcum* 7Б, был выделен из ризосферы пшеницы (дерново-подзолистая почва). Для сверхсинтеза ПГБ использовалась среда Берка, содержащей 20 г/л сахарозы как основного источника углерода. Все эксперименты проводились в лабораторных условиях при перемешивании в микробиологических колбах. Молекулярная масса ПГБ, выделяемого из бактериальных клеток, достигает более 1700 кДа. Она была снижена путем введения в ростовую среду специальных агентов, ингибирующих синтез полимера клетками *A. chroococcum*: поли(пропилен гликоля) (ППГ, ММ 0,4 кДа) (150 мМ спустя 12 часов после начала ферментации) и ацетата натрия (60 мМ сразу при начале ферментации). Для дальнейшего снижения молекулярной массы был использован химический способ, основанный на кислом гидролизе выделенного полимера в растворе хлороформа. Раствор ПГБ титровался хлороформенным раствором соляной кислоты при постоянном перемешивании. Гидролиз был остановлен нейтрализацией раствора по достижении значения молекулярной массы 25 кДа.

Для биосинтеза сополимера в культуральную среду *A. chroococcum* 7Б спустя 12 часов с начала культивации добавляли дополнительный источник углерода – поли(этилен гликоль) (ПЭГ, ММ 0,3 кДа) в концентрации 150 мМ. Было показано, что дальнейшее увеличение концентрации ПЭГ ингибирует рост, снижает синтез ПГА и его молекулярную массу. Таким образом, была использована оптимальная концентрация ПЭГ. Эксперимент проводился в течение 72 часов. Оптическую плотность контролировали путем нефелометрии.

Определение молекулярной массы полимера. Молекулярная масса ПГБ, а также его сополимера ПГБ-ПЭГ была определена методом гелепроникающей хроматографии Waters (Alliance Waters, США). Также молекулярная масса определялась вискозиметрически на вискозиметре RT RheoTec (RheoTec, Германия). При этом молекулярная масса была рассчитана с использованием уравнения Марка-Куна-Хаувинка.

Ядерный магнитный резонанс. Изучение строения полимеров проводилось с помощью метода ^1H -ЯМР спектроскопии. Растворы ПГБ, а так же ПГБ-ПЭГ в дейтерированном хлороформе исследовались на спектрометре MSL-300 (Bruker, Германия) при рабочей частоте 400 МГц.

ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием. Возрастание количества концевых гидрофильных групп при химическом снижении молекулярной массы регистрировалось с помощью ИК-спектроскопии. Спектры полимерных образцов снимались на Фурье спектрометре IFS-66 v/s (Bruker, Германия) в области $4000\text{--}600\text{см}^{-1}$.

Определение гидрофильности полимерного материала. Гидрофильность поверхности полимера определялась на полимерных пленках путем измерения динамического угла натекания на цифровом углометре Drop Shape Analysis System - DSA100 (KRÜSS, GmbH, Германия). Полимерные пленки, нанесенные на предметное стекло были изготовлены методом литья из раствора на стеклянную поверхность. При этом анализировали внешнюю (не прилежащую к стеклу) поверхность пленки. Аппроксимация формы капли осуществляется методом Лапласа-Юнга.

Системы пролонгированного высвобождения белков на основе полиоксиалканоатов.

Белки, инкапсулируемые в полимерную матрицу микрочастиц. Для изучения систем пролонгированного высвобождения в данной работе был использован лизоцим (Sigma Aldrich, Германия) – фермент мурамидаза, полученный из яичного белка. Его молекулярная масса равняется 14,3 кДа, $pI = 11,35$. Помимо лизоцима в работе был использован бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma Aldrich, Германия) – белок плазмы крови, молекулярная масса равняется 66,4 кДа, pI 4,7. Для исследований на конфокальном микроскопе был использован флуоресцентно меченный БСА (ФИТЦ-БСА) и лизоцим (ФИТЦ-лизоцим) (Sigma Aldrich, Германия).

Получение полимерных микрокапсул из ПГБ с инкапсулированным БСА. Микрокапсулы получали методом «водная фаза/масляная фаза/водная фаза» (В/М/В, W). Изначально была приготовлена эмульсия водного раствора белка в хлороформенном растворе ПГБ ($MW = 826$ кДа) путем длительного встряхивания на вортексе, которую затем добавляли по каплям в раствор конечного эмульгатора - водный раствор поливинилового спирта (ПВС). Перемешивание проводили с помощью верхнеприводной мешалки R2R 2021 (Heidolph, Германия). После полного испарения органического растворителя, микрокапсулы отделяли центрифугированием на центрифуге 5707R (Eppendorf, Германия), а затем промывали дистиллированной водой до полного удаления эмульгатора. Затем микрокапсулы лиофилизировали, используя Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Martin Christ, Германия).

Получение композита гидроксиапатита с лизоцимом. Композит нано-гидроксиапатита (ГА) с лизоцимом получали с помощью лиофильного высушивания дисперсии наночастиц гидроксиапатита в растворе белка. Для этого навеску лизоцима растворяли в 1 мл деионизированной воды. Затем в нее добавляли 900 мг ГА и интенсивно перемешивали на вортексе. Не допуская оседания частиц нано-гидроксиапатита, полученную дисперсию немедленно замораживали в жидком азоте. После заморозки, ее помещали в камеру и лиофилизировали в течение ночи с использованием Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Martin Christ, Германия).

Получение полимерных микрочастиц с инкапсулированным в них композитом нано-гидроксиапатита с лизоцимом. Микроструктуры получали при помощи использования метода «твердая фаза/масляная фаза/водная фаза», заключающегося в покрытии частиц белка с носителем оболочкой из полимера. Изначально была приготовлена дисперсия композита ГА с белком в хлороформенном растворе ПГБ молекулярной массы 25 и 255 кДа, либо сополимера ПГБ-ПЭГ. Полученную суспензию тщательно перемешивали на вортексе. Конечный коллоидный раствор по каплям добавляли к раствору ПВС. Перемешивание проводили на верхнеприводной мешалке R2R 2021 (Heidolph, Германия) при 700 об/мин. После полного испарения органического растворителя микрочастицы осаждали центрифугированием с использованием центрифуги 5707R (Eppendorf, Германия), а затем промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора. Затем микрочастицы лиофилизировали, используя Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Martin Christ, Германия).

Исследование пролонгированного высвобождения лизоцима и БСА из полимерных микроструктур *in vitro*. Пролонгированное высвобождение белка из полученных микроструктур проводили при 37°C в термостате ТС 1/20 (Россия) в фосфатном буфере с добавлением антибактериального агента азида натрия при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере OS-10 (BioSan, Латвия). При исследовании кинетики высвобождения белка, через заданные интервалы времени полимерные микрочастицы отделяли от буфера на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия). В полученном супернатанте спектрофотометрически определяли количество содержащегося в нем белка, а оставшиеся частицы заливали свежим буфером и продолжали инкубировать в термостате для дальнейшего высвобождения.

Спектрофотометрическое определение содержания лизоцима и БСА в полученных образцах. Содержание белка в полученных образцах определяли спектрофотометрически с окрашиванием по Бредфорду, а так же методом определения концентрации белка в растворе при длине волны 280 нм на спектрофотометре UV-1601PC (Shimadzu, Япония) при $\lambda = 595$ нм и $\lambda = 280$ нм для каждого метода, соответственно.

Исследование полученных микроструктур с помощью методов конфокальной микроскопии. Чтобы определить характер включения белка в структуры, были изготовлены микрокапсулы и микрочастицы с включенным в них ФИТЦ-БСА и ФИТЦ-лизоцимом. Приготовленную дисперсию микроструктур в воде исследовали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия) с объективом C-Apochromat63x/1.2 W corr. Возбуждение проводилось лазером с длиной волны 488 нм, радиус конфокальной диафрагмы был равен 1 диску Эри (112 мкм).

Исследование морфологии полученных микроструктур с помощью методов сканирующей электронной микроскопии. Для получения данных по морфологии частиц был использован сканирующий электронный микроскоп – Quanta 200 3D (FEI Company, США) без напыления, а также JEOL JSM-638 OLA (FEI Company, США) с напылением палладия на образцы.

Исследование деградации микрочастиц. Деградация полученных микрочастиц изучалась на протяжении всего опыта по высвобождению белка *in vitro*. Для этого микрочастицы, инкубировавшиеся в фосфатно-солевом буфере, отбирали на разных сроках инкубации, осаждали на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) и лиофилизировали с помощью Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Martin Christ, Германия). Полученные образцы были изучены с помощью электронного микроскопа Quanta 200 3D (FEI Company, США) без напыления.

Исследование стабильности белка высвободившегося из полимерных микрочастиц.

Определение целостности первичной структуры лизоцима, высвободившегося из полимерных микрочастиц. Для определения целостности первичной структуры лизоцима, высвобождаемого из полимерных микрочастиц, была проведена стандартная процедура электрофореза по Лэммли в ПААГ в присутствии SDS с использованием камеры BG-verMINI (Baugene, Китай). Для проведения электрофореза были использованы концентрирующий (7% акриламида (АА) и 0,4% метиленабисакриламида (МБА)) и разделяющий (14% АА и 0,8% МБА) гели. Образы белка из микрочастиц, инкубированных в течение различных промежутков времени, были нанесены на дорожки вместе с белками-маркерами и контрольными образцами лизоцима. После прохождения электрофореза гели помещались в раствор для фиксации, а затем окрашивали с помощью Кумасси R-250 в течение ночи. Затем гель отмывали раствором для промывки гелей при нагревании.

Исследование вторичной структуры лизоцима, высвободившегося из полимерных микрочастиц. Для определения целостности вторичной структуры лизоцима, высвобождаемого из полимерных микрочастиц, белок был исследован с помощью метода кругового дихроизма на дихроиметре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания). В образцах белка, отобранных спустя 14 суток инкубации полимерных микрочастиц, повышали концентрацию с помощью мембранных центрифужных концентраторов (Millipore, Германия). В качестве контрольного образца сравнения исследовался свежеприготовленный раствор лизоцима, а так же эталонный спектр лизоцима, полученный из литературных данных [Matsuo K., 2004]

Исследование третичной структуры высвободившегося белка методом определения его ферментативной активности. Определение ферментативной активности лизоцима, высвободившегося из полимерных микрочастиц, осуществляли на спектрофотометре UV-1601PC (Shimadzu, Япония). В качестве субстрата для лизоцима использовали лиофилизированную культуру *Micrococcus luteus*. Активность оценивалась как процентное отношение активности образца к контрольному образцу нативного лизоцима.

Выделение мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга крыс линии Wistar. Для тестирования биосовместимости полимерных микрочастиц мезенхимальные стволовые клетки (МСК) были выделены из костного мозга крысы. Для этого были использованы трехдневные крысы линии Вистар, у которых *ex vivo* были выделены диафизы бедренных костей. Кости были очищены от мышечной ткани, простерилизованы и промыты. Далее они были помещены в керамическую ступку с ростовой средой – модифицированной средой Игла (DMEM, Invitrogen, США), содержащей фермент для расщепления внеклеточного матрикса коллагеназу I. После гомогенизации, полученный материал был помещен в чашках Петри на шейкер для инкубации в течение часа. Затем, после замены среды, клеточный материал был помещен в термостат при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂. После суток инкубации, остатки костей были удалены. На вторые сутки инкубации на чашках Петри был получен монослой клеток.

Оценка цитотоксичности микрочастиц, загруженных лизоцимом *in vitro*.

Для оценки цитотоксичности микрочастиц, загруженных композитом ГА/лизоцим, микрочастицы инкубировали с МСК крысы. Клетки инкубировали в термостате при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в ростовой среде на основе модифицированной среды Игла (DMEM, Invitrogen, США) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, до образования монослоя. При замене среды к клеткам были добавлены стерильные микрочастицы, загруженные

композитом ГА/лизозим в различных концентрациях, а также пустые частицы из соответствующих полимеров в качестве контроля. После 36 часов инкубации клетки были отделены от частиц, и их выживаемость была оценена методом ХТТ (ХТТ-proliferation kit, Biological Industries, Израиль). Этот метод основан на способности активных митохондрий живых клеток превращать соли тетразолия в соли формазана. Результаты были представлены в виде доли (в процентах) жизнеспособных клеток по отношению к положительному контролю, в который микрочастицы не добавлялись.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Материал поли(3-гидроксibuтират).

Получение поли(3-гидроксibuтирата) различной молекулярной массы. В нашей лаборатории был разработан способ получения полиэфира ПГБ. С помощью культивации штамма-сверхпродуцента *Azotobacter chroococcum* 7В в различных условиях нами были синтезированы два гомополимера с заданной молекулярной массой (ММ), необходимой для разработки систем пролонгированного высвобождения белков. Следует отметить, что от ММ зависит большое количество физико-химических (гидрофобность, кристалличность и др.), а также биохимических (скорость биорезорбции, биосовместимость и т.д.), свойств материала. Для контроля ММ нами была разработана методика, основанная на добавлении агентов, ингибирующих рост биомассы *Azotobacter chroococcum* 7В и в конечном счете снижающих ММ ПГБ – ацетата натрия и ППГ. При этом ППГ, связываясь с активным центром фермента ПГБ-полимеразы, обрывал синтез полиэфирной цепи ПГБ, не встраиваясь в полимерную цепь. ММ полимера при этом равнялась 826 кДа, (условно обозначим как ПГБ 800). Механизм снижения ММ посредством ацетата натрия связан с увеличением количества центров полимеризации в цитоплазме бактериальных клеток. Количество параллельно синтезируемых цепей становится больше, а их длина сокращается. ММ синтезируемого при этом полимера равнялась 255 кДа (условно обозначим как ПГБ 250). Параметры синтеза приведены в таблице 1

Таблица 1 Параметры синтеза ПГБ штаммом-продуцентом *A. chroococcum* 7В в культуральной среде с сахарозой в качестве основного источника углерода и ацетатом натрия в качестве дополнительного источника углерода

Агент, снижающий ММ	Урожай биомассы, г/л среды	Содержание ПОА в биомассе, % от сухого веса клеток	Молекулярная масса ПОА, $\times 10^6$ Да
–	5,8 $\pm$ 0,6	83,4 $\pm$ 3,1	1,71
ППГ	3,3 $\pm$ 0,5	79,8 $\pm$ 2,4	0,83
Ацетат натрия	3,9 $\pm$ 0,6	66,9 $\pm$ 3,0	0,25

Системы пролонгированного высвобождения белков на основе микрочастиц из ПГБ и его сополимеров.

Разработка систем пролонгированного высвобождения белков является очень важной задачей современной биотехнологии и фармакологии. Среди широкого спектра приложений таких систем следует отметить в первую очередь тканевую инженерию, как наиболее перспективное направление регенеративной медицины. Однако перед тем как создавать такие полимерные системы с загруженными терапевтическими белками и факторами роста для тканевой инженерии, необходимо построить модель, на которой будут определены параметры, влияющие на характер высвобождения. На первом этапе работы исследовались полые микрокапсулы с инкапсулированным белком БСА, далее их сменили сплошные композитные микрочастицы, загруженные белком лизоцимом.

Микрокапсулы для пролонгированной доставки модельного белка БСА.

Изначально нами были получены микрокапсулы из ПГБ 800 кДа, загруженные модельным белком БСА. Примеры полученных микрокапсул можно видеть на микрофотографиях, приведенных на рисунке 1. Микрокапсулы представляют собой полые частицы сферической формы и диаметром от 10 до 25 мкм, внутри которых инкорпорирован белок, что хорошо видно при рассмотрении частицы, рассеянной пучком ионов. При этом хорошо видна полость внутри частицы, ограниченная монолитной стенкой, в которой и находится белок. На изображениях с конфокального микроскопа видно диффузное расположение белка внутри микрокапсул, в то время как на поверхности микрочастиц находятся скопления адсорбированного белка. Белок, адсорбированный на поверхности частиц, высвобождается в первую очередь, тогда как инкапсулированный БСА обеспечивает пролонгированное высвобождение.

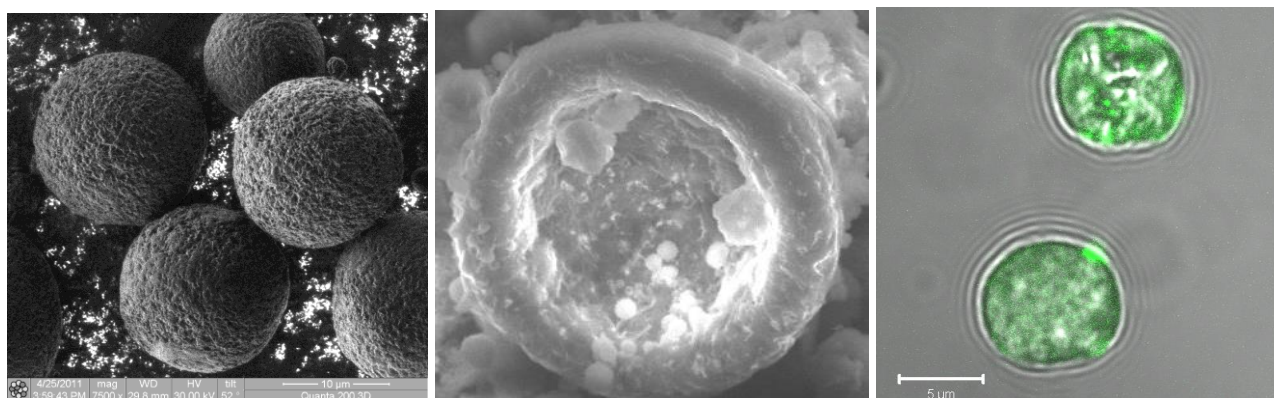


Рисунок 1 Микрофотографии микрокапсул из ПГБ с инкапсулированным БСА, разрез микрокапсулы, рассеянной пучком ионов, полученные с помощью СЭМ, а также распределение ФИТЦ-БСА в микрокапсулах, полученное с помощью конфокальной микроскопии.

Высвобождение БСА из микрокапсул в модельных физиологических условиях продолжалось более чем 8 суток. Кинетический профиль представлен на рисунке 2. По данным опыта были рассчитаны параметры инкапсулирования БСА (табл. 2). Как мы видим, степень загрузки является довольно низкой – около 1,92 %. Это обуславливается особенностями методики, в которой белок, изначально находящийся в виде раствора, подвергается сильным воздействиям. По другим параметрам частицы являются приемлемыми. Значение бёрст-эффекта, характеризующего начальное взрывное высвобождение белка из полученных частиц, находится в районе 50%. Это означает, что частицы смогут обеспечить как первичную доставку препарата в требуемой дозе, так и последующее длительное поддержание постоянной терапевтической концентрации в окружающей среде. Значение выхода полимерных микроструктур так же является приемлемым.

Таблица 2. Параметры инкапсулирования структур из ПГБ

Степень загрузки %	Выход микрокапсул %	Величина burst-effect %
1,92 ± 0,51	46,62 ± 5,96	49,94 ± 3,50

В то время как первичный бёрст-эффект обуславливается процессами десорбции белка с поверхности микрокапсул, пролонгированное высвобождение БСА осуществляется за счет деструкции стенок микрокапсул, после чего белок легко выходит в окружающую среду. Это продемонстрировано с помощью исследования мкроструктур методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 2). На нем видны микрокапсулы с высвободившимся белком, стенки которых при этом деформируются.

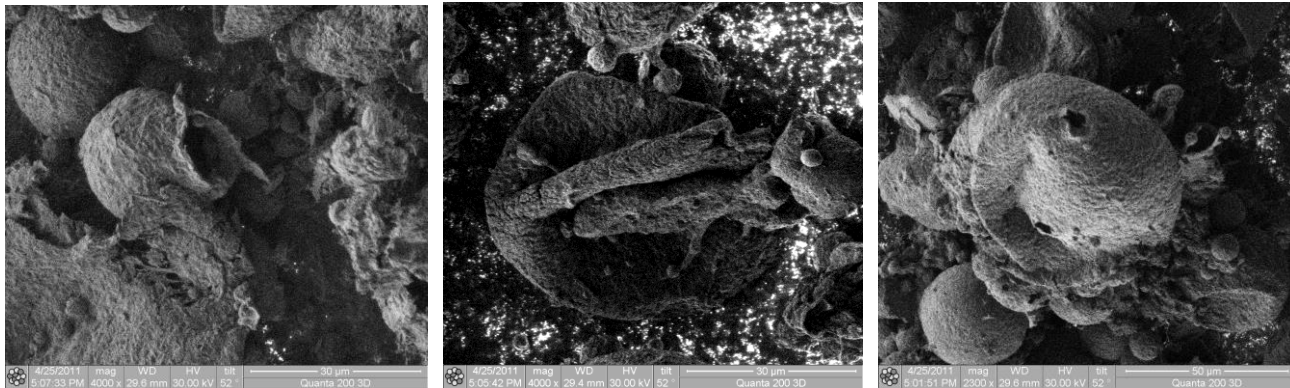


Рисунок 2 Образцы микрокапсул из ПГБ с инкапсулированным БСА после проведения опыта *in vitro* в течение 200 часов.

Таким образом, на первом этапе работы была разработана оригинальная методика инкапсулирования модельного белка в частицы из биоразлагаемого полимера. Полученные микрокапсулы из ПГБ, представляют собой весьма удачный пример создания пролонгированной формы препарата белковой природы. Однако низкий процент вхождения белка в капсулы вносит ограничение на создание на их основе новой пролонгированной формы терапевтического белка. В связи с этим, в дальнейшем, методика создания микрочастиц, загруженных белком, была кардинально изменена, что позволило достичь существенных успехов.

Сплошные микрочастицы для пролонгированной доставки модельного белка лизоцима.

Во второй части работы была разработана методика инкапсулирования белка в сплошные полимерные микрочастицы с целью устранения недостатков системы пролонгированного высвобождения белков, основанной на микрокапсулах, а именно низкой степени загруженности, а также высокого уровня начального взрывного высвобождения – бёрст-эффекта. При этом модельный белок был заменен на лизоцим.

Известно, что использованный ранее метод двухэтапного эмульгирования «водная фаза/масляная фаза/водная фаза» приводит к денатурации белка на границе раздела фаз вода – органический растворитель. Чтобы обойти эту стадию приготовления микрочастиц, белок вносился в органический растворитель в твердом состоянии по методике двухэтапного эмульгирования «твердая фаза/масляная фаза/водная фаза». При этом использовалось вспомогательное вещество – наночастицы гидроксиапатита (ГА), придающие стабильности белку в твердом состоянии. ГА является основным неорганическим компонентом кости и отвечает требованиям биосовместимости и стабильности к физико-химическим воздействиям. На электронных микрофотографиях (рис.3) мы видим нанокристаллы ГА, образующие агломераты, диаметр которых приблизительно равен 3 μm . После загрузки белка на носитель путем адсорбции мы уже не наблюдали подобной картины из-за слоя белка, покрывавшего наночастицы. Композитные структуры также имели размер около 3 μm . Массовое соотношение белок/ГА было выбрано как 10/90.

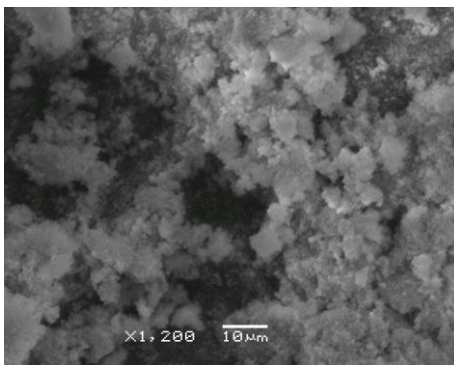
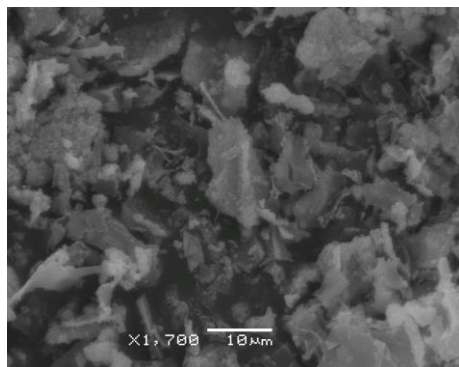


Рисунок 3.
Электронные
микрофотографии
наноГА (А) и
композиата
наноГА/лизоцим (Б)

Далее композитные частицы суспендировались в хлороформенном растворе полимера, после чего данный коллоид уже эмульгировался в водном растворе поливинилового спирта (ПВС). Этот метод практически не оказывает разрушающего воздействия на белок, так как последний контактирует с хлороформом лишь в сухом виде, а, следовательно, его денатурация, опосредованная растворителем, невозможна, так как белок в безводном органическом растворителе проявляет меньшую конформационную подвижность, чем в водных растворах. Схема всего процесса представлена на рисунке 4.

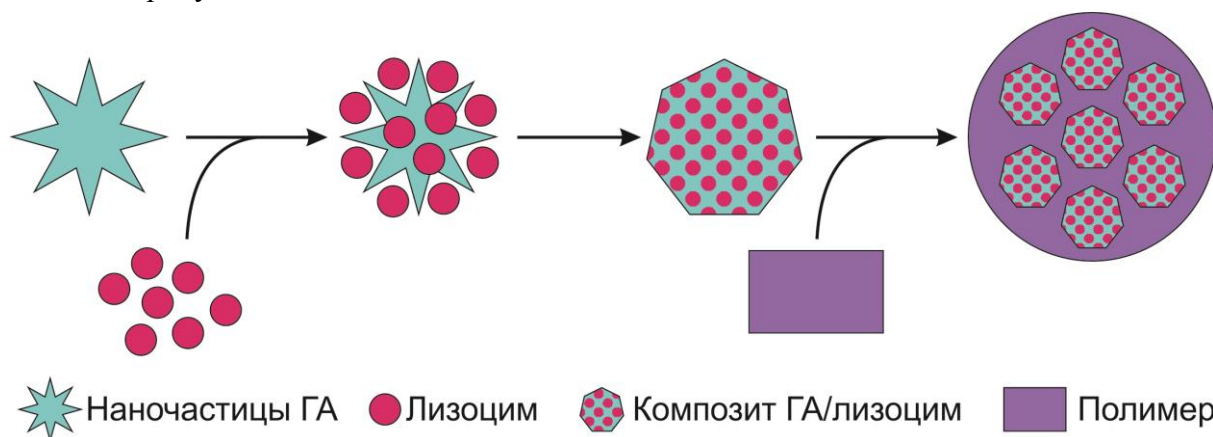


Рисунок 4. Схема приготовления полимерных микрочастиц, загруженных композитом наногидроксиапатита с лизоцимом.

Для разработки самого метода инкапсулирования, а также первичных испытаний мы выбрали гомополимер ПГБ 250 кДа – гомополимер средней молекулярной массы, достаточно быстро биodeградирующий и обладающий необходимыми физико-химическими свойствами, такими как среднее значение гидрофобности и достаточно низкое значение приведенной вязкости. На электронных микрофотографиях видны частицы правильной округлой формы размером $24,3 \pm 8,4 \mu\text{m}$ и пористой поверхностью (рис.5). Рассчитанные степень загрузки и эффективность инкапсулирования составляли соответственно 39,10% и 0,39%. Вхождение лизоцима в полимерный матрикс микрочастиц показано с помощью сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. С помощью анализа флуоресценции вдоль линии сечения образца видно, что белок включается в микрочастицы в виде агломератов, что является положительной характеристикой, так как белок, находящийся в агрегатах более устойчив к влиянию гидрофобного окружения полимерного матрикса и менее склонен к денатурации.

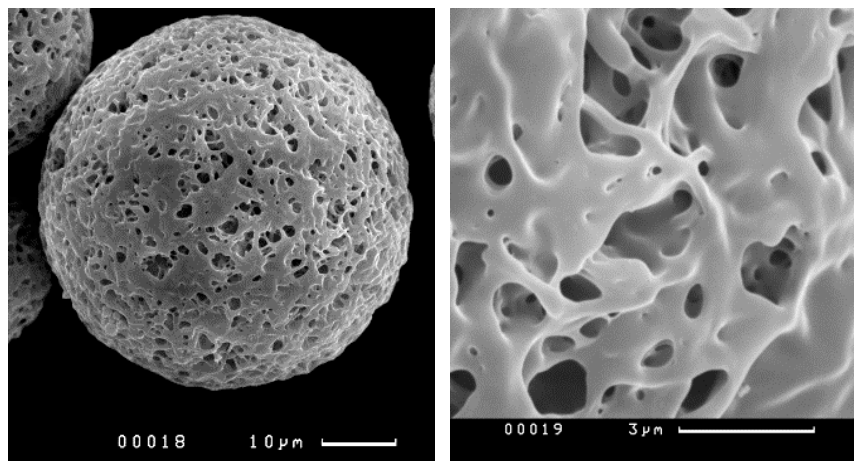
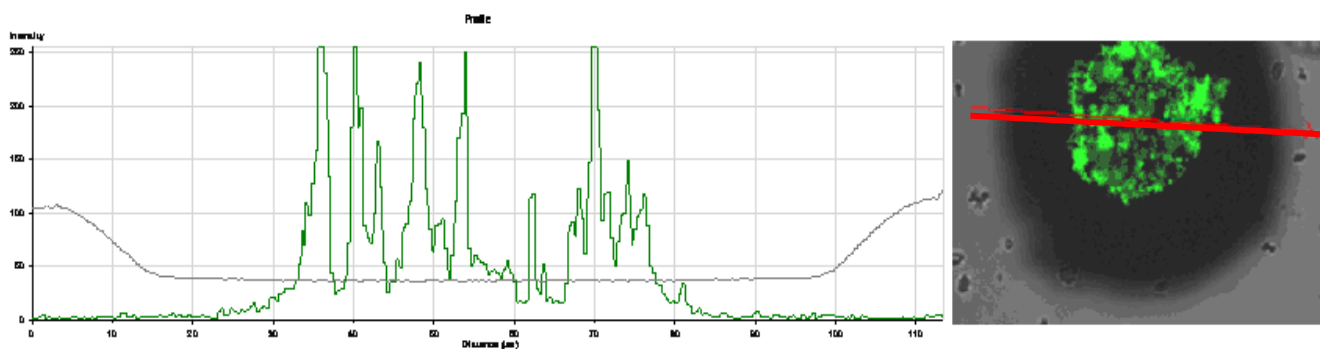


Рисунок 5. Электронные микрофотографии загруженных лизоцимом микрочастиц, основанных на ПГБ 250 кДа и их поверхности (сверху). Распределение флуоресценции (зеленая кривая) вдоль линии сечения (красная прямая) в образце микрочастиц (снизу).



Высвобождение белка из микроструктур продолжалось в течение более чем 25 суток (рис. 6). На нем видно, что выход белка характеризовался высоким уровнем начального взрывного высвобождения, в то время, как на этапе пролонгированного высвобождения высвобождалась лишь малая его часть.

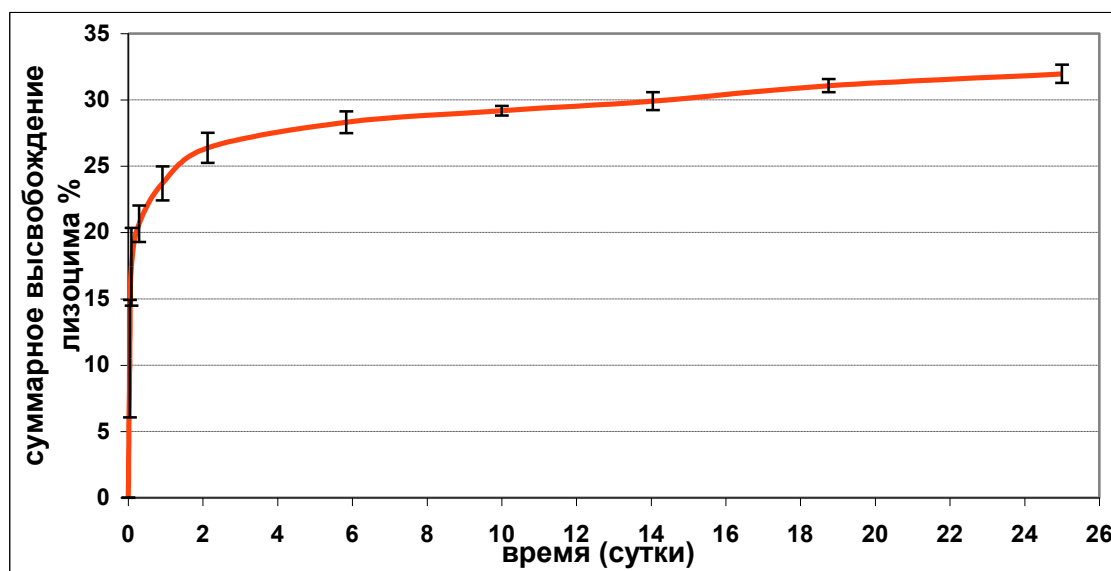
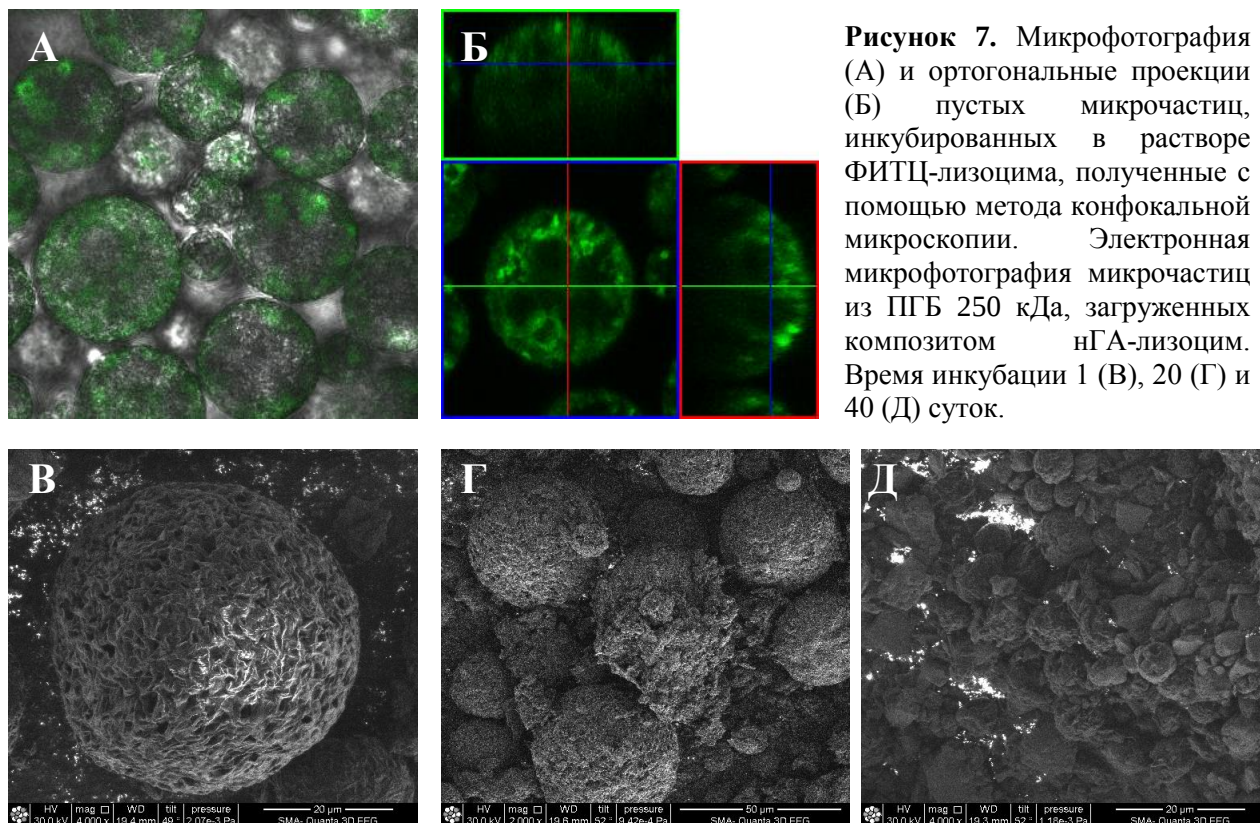


Рисунок 6. Кинетический профиль высвобождения лизоцима из микрочастиц, основанных на ПГБ 250 кДа

Известно, что на начальной стадии взрывного высвобождения происходит десорбция макромолекул с поверхности микрочастиц, а также из мезопор, связанных с поверхностью. На более поздних этапах высвобождения в ходе гидратации и деградации биоразлагаемой полимерной основы системы средний размер пор, ведущих в окружающее пространство, растет и в определенный момент наступает фаза пролонгированного высвобождения вещества из полимерных микрочастиц. То есть высвобождение белка из полимерных микрочастиц проходит по двум параллельным

механизмам: посредством диффузии, а также при деградации полимерной матрицы. Подтверждение этой модели приведено на рисунке 7. В первом случае в инвертированном эксперименте показано диффузионное вхождение белка в полимерных матрикс пустых микрокапсул, а значит, возможен и обратный процесс – высвобождение белка посредством диффузии. Во втором случае показана деградация полимерной матрицы в процессе длительной инкубации микрокапсул *in vitro*. Это означает, что сначала высвобождение белка происходит лишь посредством диффузии, но со временем к ней добавляется еще и деградация самих микрокапсул.



С помощью математической обработки экспериментальных данных показано, что высвобождение лизоцима на начальном временном промежутке описывается степенной функцией с линейной частью вида $y = a(Kx)^b - a\pi Kx$, где $y = M_t/M_0$ – отношение кумулятивного количества высвободившегося вещества в момент времени t к начальному моменту, а $K = D/r^2\pi$ (D – коэффициент диффузии, r – радиус микрокапсул), a – нормировочный коэффициент, b – показатель степени, близкий к 0,5. Пролонгированное высвобождение характеризуется экспоненциальной зависимостью вида $y = 1 - K \exp(-Ax)$, где $y = M_t/M_0$, $A = \pi^2 D/r^2$, а K – нормировочный коэффициент. Аппроксимации экспериментальных данных по этим функциям приведены на рисунке 8. Степень аппроксимации, близкая к единице в обоих случаях показывает состоятельность данной модели.

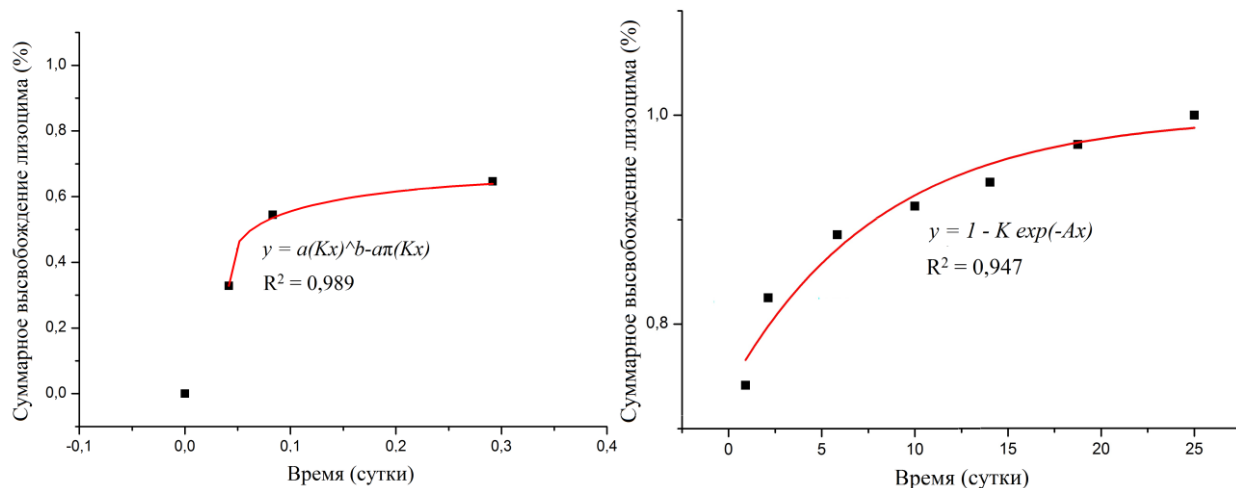


Рисунок 8. Аппроксимация начального (А) и длительного (Б) периодов высвобождения лизоцима из микрочастиц, основанных на ПГБ 250 кДа по степенной функции с линейной частью и экспоненциальной зависимости.

Биосинтез модифицированных полимеров для эффективного инкапсулирования лизоцима в полимерные микроструктуры. Для решения проблемы сильного начального взрывного высвобождения при небольшом количестве белка, высвобождающегося пролонгированно, необходимо было увеличение гидрофильности полимерного материала. Для этого были использованы два пути: химическое снижение молекулярной массы с помощью кислого гидролиза, приводящее к увеличению количества гидрофильных концевых групп, и биотехнологическая сополимеризация с амфифильным поли(этилен гликолем) (ПЭГ). В первом случае раствор ПГБ 255 кДа титровался соляной кислотой до того момента, пока молекулярная масса (ММ) не снизилась до 25 кДа. Процесс контролировался вискозиметрическим измерением ММ (рис. 9). Во втором случае при биосинтезе ПГБ в среду *Azotobacter chroococcum* 7Б вносился дополнительный источник углерода – ПЭГ, вследствие чего образовывался сополимер ПГБ-ПЭГ. На ^1H ЯМР-спектре (рис. 10) видны пики, соответствующие ПЭГ, связанном с цепью ПГБ. На кривых, приведенных на рисунке 11 хорошо заметно угнетение роста биомассы при внесении в культуральную срежу ПЭГ. Штамм-продуцент при этом сильно изменяет свою морфологию. Увеличение гидрофильности образцов продемонстрировано с помощью динамического измерения контактного угла с водой (таблица 3) – его значение упало на $\sim 10^\circ$ и составило $83,3^\circ$ для ПГБ 25 кДа и $85,8^\circ$ для ПГБ-ПЭГ. Все это говорит нам о достижении промежуточной цели – создании двух новых материалов с заданными свойствами.

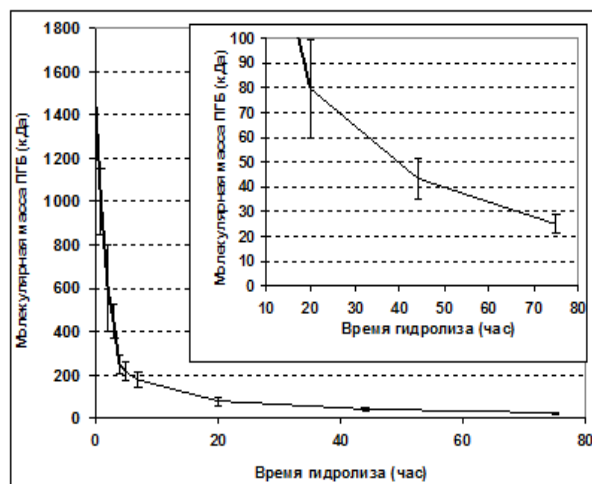


Рисунок 9. Ход гидролитического разложения высокомолекулярного ПГБ.

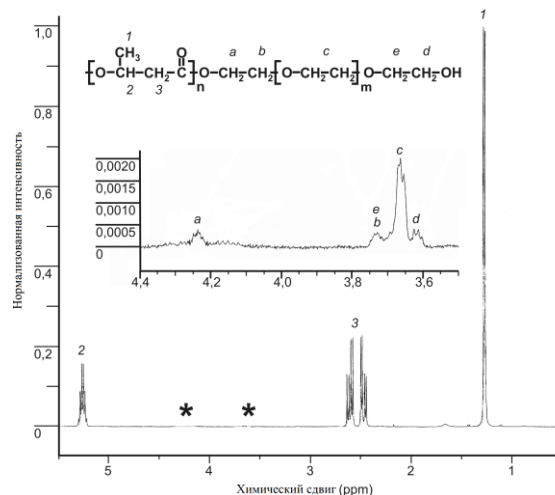


Рисунок 10. ЯМР спектр сополимера ПГБ-ПЭГ

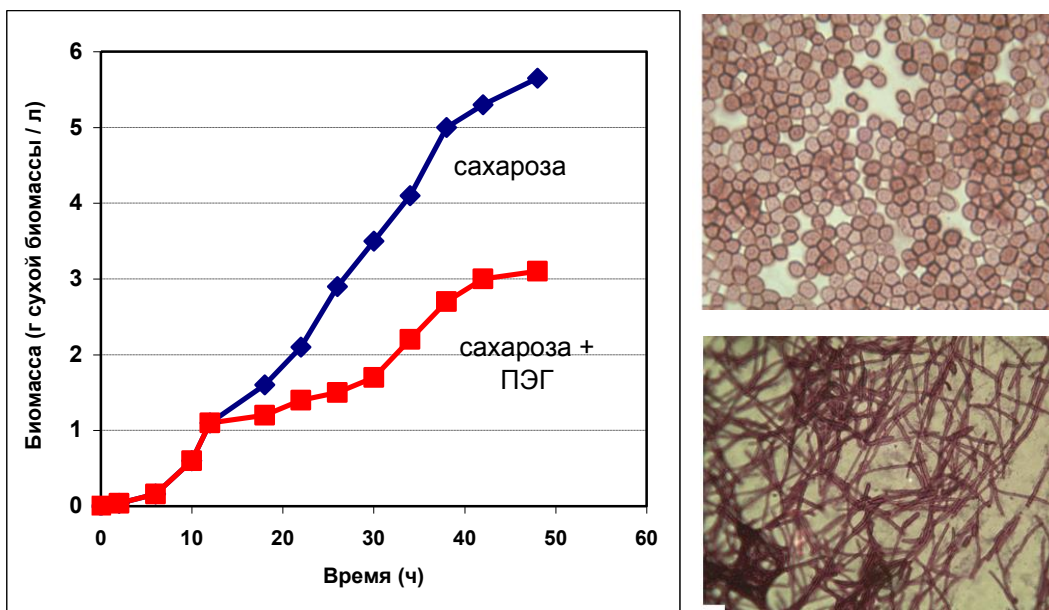


Рисунок 11. А – кривая роста *Azotobacter chroococcum* в среде без добавления и с добавлением поли(этиленгликоля), В – микрофотография *Azotobacter chroococcum* в среде без добавления ПЭГ (72 ч), С – микрофотография *Azotobacter chroococcum* в среде с добавлением ПЭГ (72 ч)

Таблица 3. Значения контактного угла с водой для пленок, изготовленных из модифицированных полимерных материалов.

Полимер	ПГБ 250 кДа	ПГБ 25 кДа	ПГБ-ПЭГ
Значение контактного угла	$93.99^\circ \pm 0.56$	$83.30^\circ \pm 1.79$	$85.79^\circ \pm 2.21$

Получение и характеристика полимерных микрочастиц с инкапсулированным модельным белком лизоцимом на основе модифицированных полимеров. Для создания новых частиц, загруженных лизоцимом, мы использовали ПГБ 25 кДа и ПГБ-ПЭГ в качестве носителей с усовершенствованными физико-химическими свойствами (рис 12). Размеры частиц составляли 22.4 ± 6.4 $\mu\text{м}$ и 25.1 ± 7.2 $\mu\text{м}$. Поверхность частиц так же не отличалась от первоначальных. Из данных о степени загрузки (СЗ), эффективности инкапсулирования (ЭИ), а также величине бёрст-эффекта (БЭ) (табл. 7) видно, что низкомолекулярный гомополимер обладает низким сродством к полимеру – СЗ частиц ПГБ 25 кДа ниже остальных почти в два раза. Для сополимера этот показатель оказался примерно равен частицам, на основе высокомолекулярного гомополимера. То есть при снижении молекулярной массы на порядок происходило снижение способности ПГБ связывать лизоцим. Скорее всего, это объясняется повышением кристалличности по отношению к высокомолекулярному полимеру, что приводит в дальнейшем к снижению эффективности инкапсулирования, показанному рядом авторов [Schugens С., 1994]. При проведении сополимеризации с поли(этилен гликолем) этого не происходит и эффективность инкапсулирования остается высокой.

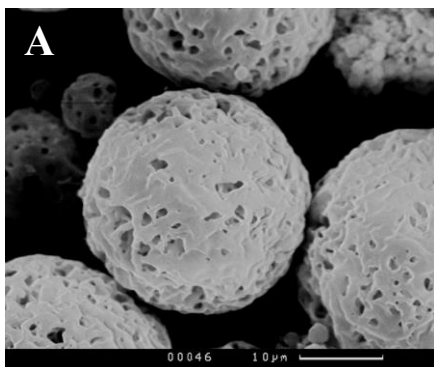
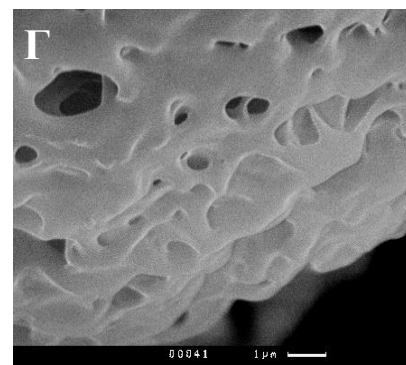
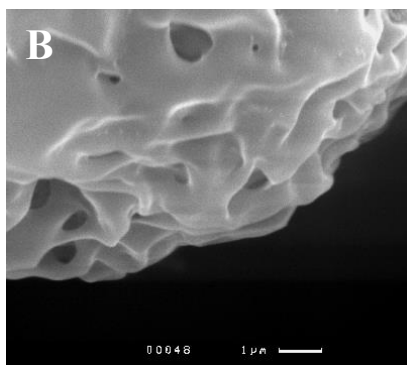
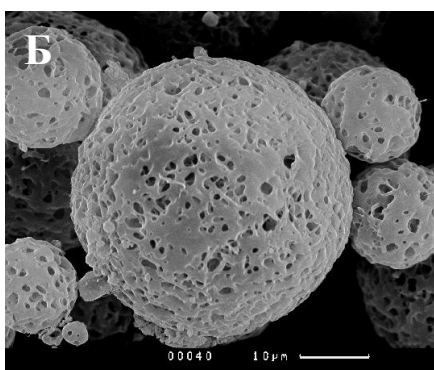


Таблица 4. Параметры инкапсулирования лизоцима в частицы, основанные на различных полимерах

Полимер	ЭИ %	СЗ %	БЭ %
ПГБ 250 кДа	39.10	0.39	64,65
ПГБ 25 кДа	20.53	0.21	43,55
ПГБ-ПЭГ	38.13	0.38	21,82

Рисунок 12. Морфология микрокапсул, основанных на ПГБ 25 кДа (А,В), ПГБ-ПЭГ (Б, Г)



Кинетика высвобождения лизоцима из полимерных микрокапсул, основанных на модифицированных полимерах. Исследование кинетики высвобождения лизоцима из микрокапсул, на основе модифицированных полимеров показало, что снижение гидрофобности материала носителя резко изменяет вид кинетического профиля высвобождения. На рисунке 13 видно, профили высвобождения лизоцима из частиц ПГБ 25 и ПГБ-ПЭГ значительно более пологие, а фаза пролонгированного высвобождения выражена значительно в большей степени, нежели для микрокапсул из высокомолекулярного гомополимера. На гистограмме, изображенной на рисунке 13, хорошо видно, что наилучшими характеристиками обладает сополимер с поли(этилен гликолем): более 80% белка высвобождается из таких частиц пролонгировано, в то время как лишь малая его часть выходит в первые часы. Низкомолекулярный полимер так же продемонстрировал хорошую кинетику высвобождения, однако начальный взрывной выброс вещества по-прежнему вносил слишком существенный вклад: более 40% белка высвободилось в первые часы. Таким образом, суммируя вышеперечисленные показатели, а так же имея в виду, что эффективность инкапсулирования лизоцима в микрокапсулы из ПГБ-ПЭГ достаточно высока, можно говорить о том, что по кинетике высвобождения белка сополимер является наилучшим носителем для лизоцима. Как мы предполагаем, данные результаты связаны с амфифильностью молекул сополимера. При затвердевании полимерного раствора в водной эмульсии его молекулы укладываются гидрофобной частью внутрь полимерного матрикса, а гидрофильной частью – блоком поли(этилен гликоля) – наружу и к белку. По-видимому, это и определяет более «плотные» взаимодействия между белком и полимерным носителем, что в свою очередь предотвращает первоначальное взрывное высвобождение белка.

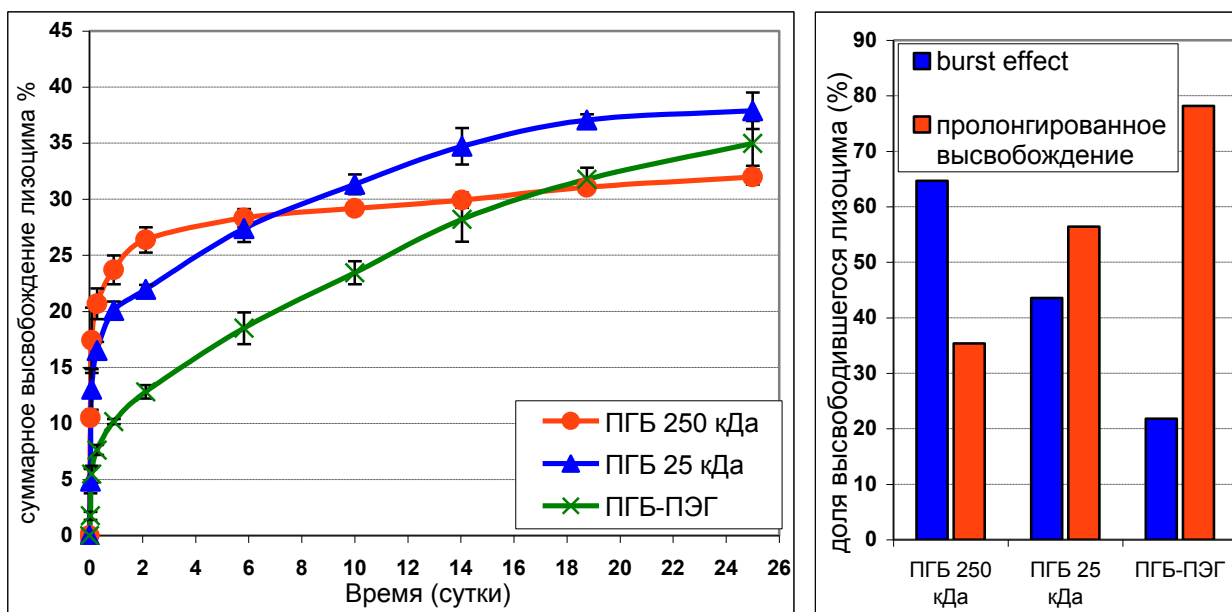


Рисунок 13. Кинетические профили высвобождения лизоцима из микрочастиц, основанных на ПГБ 250 кДа, ПГБ 25 кДа и ПГБ-ПЭГ. Доля высвободившегося лизоцима на каждом этапе пролонгированного высвобождения по отношению ко всему вышедшему белку.

Однако насколько сохраняется стабильность белка в процессе его высвобождения из полимерных микрочастиц? По литературным данным снижение гидрофобности носителя должно благотворно сказаться на сохранении нативной структуры белка.

Для решения этого вопроса, стабильность высвободившегося лизоцима была исследована на трех уровнях: первичной, вторичной и третичной структуры белка. На первом этапе была исследована целостность высвободившегося белка с помощью электрофореза по Лэммли. На электрофореграмме (рис. 14) видны полосы лизоцима и не видно полос белка меньшей молекулярной массы, а значит, полипептидная цепь лизоцима не разрушалась.

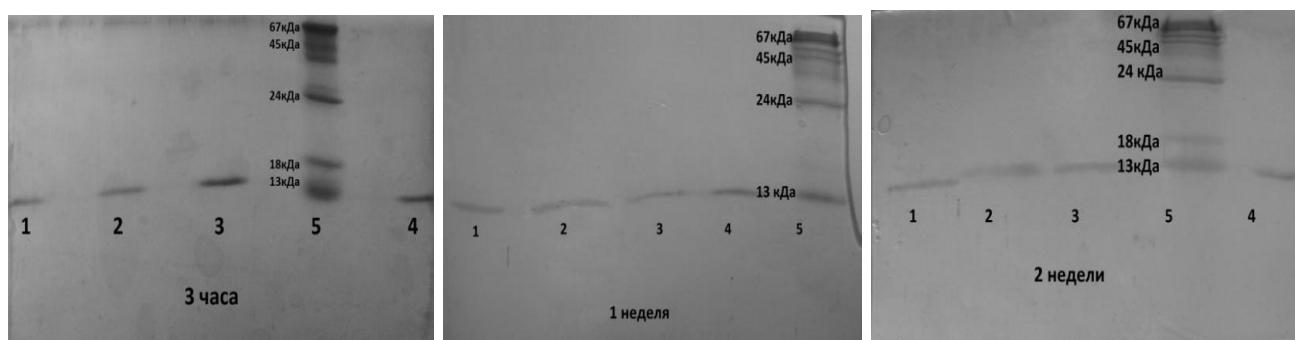


Рисунок 14. Электрофореграммы высвободившегося белка на различных этапах высвобождения. Дорожки: 1-ПГБ25, 2-ПГБ250, 3-ПГБ-ПЭГ, 4-лизоцим, 5-белки-маркеры

Исследование стабильности на уровне вторичной структуры белка проводилось при помощи метода кругового дихроизма. Спектры белка, высвободившегося из микрочастиц после 14 суток инкубации (рис 15) практически совпадают с эталонным, взятым из литературных источников [Matsuo K., 2004]. Однако спектр лизоцима, высвободившегося из микроструктур, основанных на низкомолекулярном гомополимере ПГБ 25 кДа, сильно отличается в диапазоне 180-200 нм. Это говорит нам о нарушении нативной структуры белка, высвобождающегося из микрочастиц ПГБ 25 кДа.

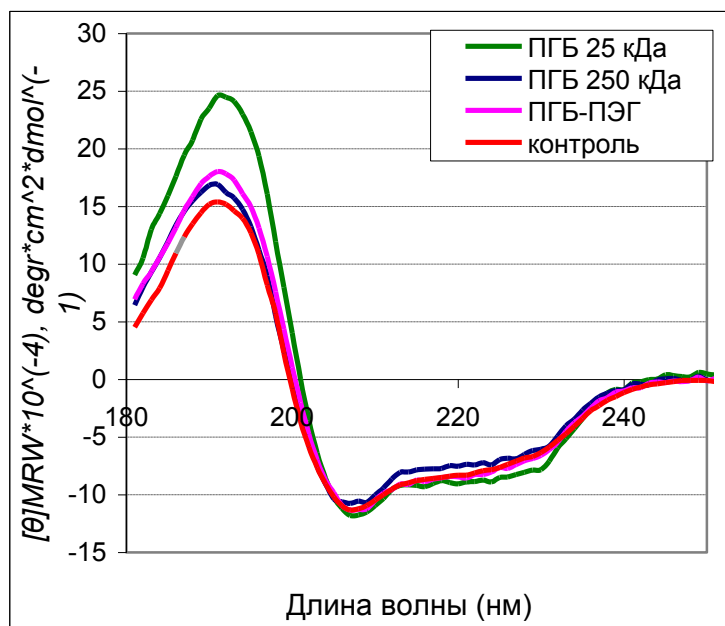


Рисунок 15. Спектры кругового дихроизма лизоцима высвободившегося после 14 суток инкубации микрочастиц, полученных из полимеров ПГБ 250 кДа ПГБ 25 кДа и ПГБ-ПЭГ

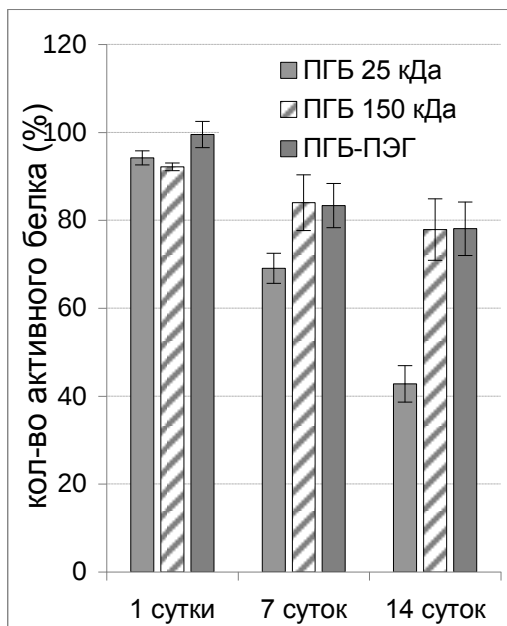


Рисунок 16. Доля активного белка высвободившегося на разных этапах высвобождения по отношению ко всему высвободившемуся белку для микрочастиц, полученных из полимеров ПГБ 250 кДа, ПГБ 25 кДа и ПГБ-ПЭГ

Самым важным параметром стабильности белка является его ферментативная активность, которая напрямую связана с его третичной структурой. Была установлена способность лизоцима к разложению клеточной стенки бактерий *Micrococcus luteus*. На рисунке 16 видно, что активность белка из микрочастиц ПГБ 25 кДа падает после 2 недель инкубации более чем в два раза. В свою очередь, высокомолекулярные гомо- и сополимер не оказывают столь губительного воздействия на высвобождающийся белок: около 80% молекул белка сохраняют свою способность к разложению муреина. Это говорит о том, что фермент, загруженный в микрочастицы на основе ПГБ-ПЭГ, сохраняет свою нативную форму в течение двух недель, что является важнейшей характеристикой для системы пролонгированной доставки белков в организм.

То есть, основываясь на эффективности инкапсулирования и кинетике высвобождения лизоцима из микросфер, наилучшими показателями обладает сополимер ПГБ-ПЭГ.

Исследование полимерных микрочастиц, загруженных лизоцимом на цитотоксичность in vitro. На заключительном этапе нами была исследована цитотоксическая реакция мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из костного мозга крысы по отношению к полученным в работе микрочастицам. Клетки, выделенные из эпифизов бедренной кости 3-дневной крысы линии Wistar, культивировались вместе с микрочастицами различного состава, загруженными лизоцимом. В качестве контрольных образцов использовались пустые микрочастицы из соответствующего полимера. На рисунке 17 показано, что после 36 часов инкубации частицы не угнетают рост клеток в диапазоне концентраций до 20 мг/мл. Таким образом, исследование полученных микрочастиц не

выявило цитотоксичности по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам, что говорит об их высокой биосовместимости.

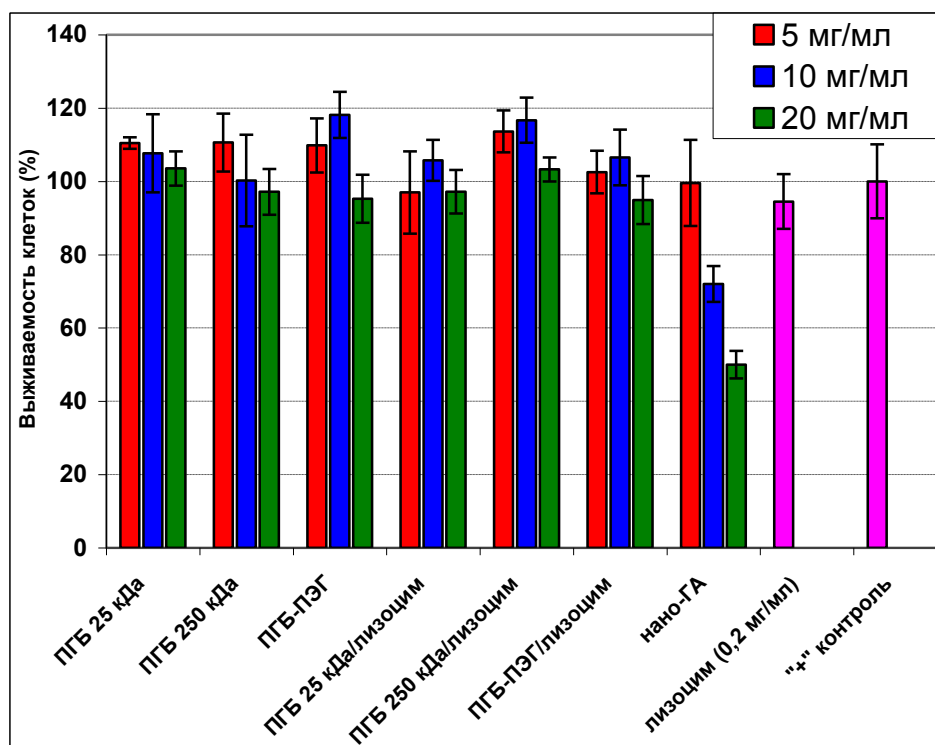


Рисунок 17.
Исследование
микрочастиц на
цитотоксичность по
отношению к МСК

ВЫВОДЫ

1. Методом контролируемого биосинтеза и химическим путем на основе гидрофобного высокомолекулярного поли(3-гидроксибутирата) получены полимеры, обладающие большей гидрофильностью: низкомолекулярный поли(3-гидроксибутират) и его сополимер с поли(этилен гликолем).

2. Разработана оригинальная методика инкапсулирования белков в сплошные полимерные микрочастицы с использованием гидроксиапатита, как носителя. Полученные частицы имеют сферическую форму, размер ~25 мкм, пористую поверхность с размером пор до 1 мкм. Эффективность инкапсулирования составляет около 40%, белок расположен в виде агломератов. Впервые получены микрочастицы из биосинтетического сополимера поли(3-гидроксибутирата) с поли(этилен гликолем), загруженные белком.

3. Высвобождение лизоцима из полимерного матрикса полученных микроструктур осуществляется по двум механизмам: деградации микрочастиц и диффузии белка из них.

4. Наилучшими параметрами высвобождения лизоцима обладали микрочастицы на основе биосинтетического сополимера поли(3-гидроксибутирата) с поли(этилен гликолем). Лизоцим сохранял свою стабильность на протяжении двух недель высвобождения белка из таких частиц *in vitro*.

5. У микрочастиц отсутствует цитотоксичность по отношению к мезенхимальным стволовым клеткам крысы на протяжении 36 часов инкубации *in vitro*.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ:

1. **Зернов А.Л.**, Бонарцев А.П., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Самсонова О.В., Феофанов А.В., Волков А.В., Гажва Ю.В., Рябова В.М., Мураев А.А., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцева Г.А. Микрокапсулы из поли(3-гидроксibuтирата) для пролонгированного высвобождения белка //Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7. – №. 4. – С. 50-57;

2. В.Г.Джавахи, Т.М.Воинова, С.Б.Поплетаева, Л.Р.Арсаланова, **А.Л.Зернов**, Г.А.Бонарцева. Комплекс пептидил-пролил-цис/транс-изомеразы из *Pseudomonas fluorescens* с биоразлагаемыми полимерами защищает растения табака от возбудителя бурой сухой пятнистости табака *Alternaria longipes* //Известия Уфимского научного центра РАН. – 2016. – Т. 3. – С. 118-120;

3. **Зернов А.Л.**, Бонарцев А.П., Яковлев С.Г., Мышкина В.Л., Махина Т.К., Паршина Е.С., Харитонов Е.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Микрочастицы из низкомолекулярного поли(3-гидроксibuтирата) для пролонгированного высвобождения паклитаксела, полученные методом пьезоэлектрического распылительного высушивания //Российские нанотехнологии. – 2017. – Т. 2. (в печати).

Статьи в иностранных периодических изданиях:

1. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomdzhiev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., **Zernov A.L.**, Zhuikov V.A., Efremov Yu.M., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. The terpolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B: effect of surface properties on cell attachment //PloS one. – 2013. – Т. 8. – №. 2. – С. e57200;

2. Bonartsev A.P., Boskhomodgiev A.P., Voinova V.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Zharkova I.I., **Zernov A.L.**, Filatova E.A., Bagrov D.V., Rebrov A.V., Bonartseva G.A., Iordanskii A.L. Degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and its derivatives: characterization and kinetic behavior. – 2012. – Т. 16. – №. 2. – С. 385-392;

3. Bonartsev A.P., **Zernov A.L.**, Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Andronova N.V., Smirnova G.B., Borisova J.A., Kalishjan M.S., Shaitan K.V., Treshalina H.M. New poly (3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration //Anti-cancer agents in medicinal chemistry. – 2017. – Т. 17.– С. 434-441;

4. Ermakova N.P., Bonartsev A.P., **Zernov A.L.**, Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Y., Merkulova I.B., Abramova T.V., Chaley V.A., Yakovlev S.G., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Bukhman V.M. Preclinical toxicity evaluation of paclitaxel biopolymer formulation //Anti-cancer agents in medicinal chemistry. – 2017 (in press).

Тезисы конференций:

1. **Zernov A.L.**, Ivanova E.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. A novel copolymer poly-(3-hydroxybutyrate)-poly(ethyleneglycol) as carrier for protein delivery. Сборник трудов XIII Российско-Китайского Симпозиума “Новые материалы и технологии”. Под общей редакцией академика РАН К.А.Солнцева. В 2-х томах, М.: Интерконтакт Наука, 2015, стр 732-735;
2. **Zernov A.L.**, Ivanova E.V., Shaitan K.V. The experimental model of lysozyme sustained release based on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethyleneglycol)/hydroxyapatite microparticles. International work-conference on bioinformatics and biomedical engineering Proceedings of IWBBIO 2014. Granada, April 7-9, 2014. Vol.2, pp. 1511-1519;
3. **A. Zernov**, E. Ivanova, G. Bonartseva and A. Bonartsev. The lysozyme sustained release system based on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) microparticles. Abstracts of the 38th FEBS Congress, page 330, Russia, Saint Petersburg, July 6–11, 2013;
4. Иванова Э.В., **Зернов А.Л.** Пролонгированное высвобождение лизоцима из микрочастиц на основе сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем., Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013», Москва, 2013г;
5. **Зернов А.Л.**, Иванов Е.А., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Бонарцева Г.А. Исследование систем пролонгированного высвобождения белков на основе микрочастиц из поли-3-гидроксibuтирата.//XIX международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2012, секция «биология», тезисы докладов, Москва, стр. 34, Москва, 2012;
6. **Зернов А.Л.**, Бонарцев А.П., Босхомджиев А.П., Иванов Е.А., Воронцова О.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Исследование инкапсулирования белков в микросферы из поли-3-гидроксibuтирата.// Сборник статей второй международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине, Санкт-Петербург, Россия; том 3; стр. 325-328, 2011г;
7. **Зернов А. Л.**, Иванов Е. А. Получение микрокапсул из поли-3-гидроксibuтирата и изучение высвобождения инкапсулированного в них белка *in vitro*.//XVIII международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2011, секция «биология», тезисы докладов, стр. 36, Москва, 2011г;
8. **Зернов А. Л.** Иванов Е. А. Исследование кинетики высвобождения БСА из микрокапсул, приготовленных из ПГБ разной молекулярной массы, *in vitro*.// Сборник трудов первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», том 3; стр. 239-240, Россия, Санкт-Петербург, 2010г.