

УДК 66.063.62, 615.07, 618.14–006

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ СИСТЕМ ДЛЯ СО-ДОСТАВКИ ПАКЛИТАКСЕЛА И ПРОИЗВОДНОГО ЭТОПОЗИДА НА ОСНОВЕ АЛЬБУМИНА И СОПОЛИМЕРОВ МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ И СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИХ ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НА ЛИНИИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ГЛИОМЫ GL261

Т.С. Ковшова, С.А. Бойко, Ю.А. Малиновская, М.А. Меркулова, С.Э. Гельперина

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

Введение. Во всем мире наблюдается неуклонный рост онкологических заболеваний, поэтому поиск новых методологических подходов, а также усовершенствование традиционной химиотерапии для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований являются приоритетными задачами онкологии [1]. Принципиально новый подход к комбинированной химиотерапии рака заключается в одновременной доставке двух противоопухолевых агентов в клетку опухоли путем включения их в наноразмерную систему доставки [2]. Такие формы обеспечивают возможность внутривенного введения трудно растворимых лекарственных веществ (ЛВ), повышение стабильности ЛВ, увеличение времени циркуляции в кровотоке или облегчение доступа в целевые органы / ткани путем повышения накопления в опухоли за счет пассивного (эффект EPR, англ. *Enhanced Permeation and Retention Effect*) или активного (рецептор-опосредованного) транспорта наночастиц (НЧ), а также снижение неспецифической токсичности за счет предсказуемого изменения биораспределения ЛВ [3; 4]. Эффективность этого подхода показана в исследованиях систем для со-доставки противоопухолевых агентов паклитаксела (PTX) и этопозид (ЕТР), которые обладают низкой растворимостью в воде и относятся к IV классу ЛВ по БКС, для лечения рака молочной железы, рака лёгких, остеосаркомы, а также злокачественных глиом [5–8]. В соответствии с принципами комбинированной химиотерапии данные ЛВ имеют различные механизмы действия [9,10]. Эффективность РТХ и ЕТР в комбинации с другими агентами в составе НЧ активно исследуется *in vitro* и *in vivo* в отношении мультиформной глиобластомы – наиболее распространенной и агрессивной глиомы [11, 12]. Для создания систем для со-доставки РТХ и ЕТР часто используют амфифильные самособирающиеся синтетические полимеры (PLGA, PEG-PLA и т.д.) [3], в то время как использование НЧ на основе человеческого сывороточного альбумина менее изучено.

Целью настоящего исследования было изучение возможности разработки системы для со-доставки РТХ и ЕТР наноразмерных систем на основе человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) и сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA) и сравнительное исследование цитотоксичности полученных форм *in vitro* на линии клеток мышинной глиомы GL261.

Материалы и методы. В работе использовали; этопозид (100 %, QILI ANTIBIOTICS, Linyi, Китай); паклитаксел (99,81 %, Shanghai Jinhe Bio-Technology Co., Ltd, Китай.); р-р человеческого сывороточного альбумина (HSA, 20 %, Плазбумин-20®, Grifols Therapeutics Inc., США); сополимер молочной и гликолевой кислот Resomer® RG 502H (лактид: гликолид 50:50) (Evonik Nutrition & Care GmbH, Германия) (PLGA), поливиниловый спирт (ПВС, 9–10 кДа, степень гидролиза 80 %, Sigma, Германия); D-маннит (Диа-М, Россия); хлористый метилен (ДХМ), ацетон, этиловый спирт, натрия хлорид (99 %, Sigma, Германия), среда для культивирования клеток DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), полисорбат 80 (Tween® 80) (Sigma, Германия), дигидрофосфат калия (Sigma-Aldrich, США), гидрофосфат натрия (Sigma-Aldrich, США); эстераза из печени свиньи лиофилизированная (Sigma-Aldrich, США); ацетонитрил (АЦН) 99,9 % и метанол (MeOH) 99,8 % марки «для ВЭЖХ».

Получение производного ЕТР. Для повышения степени включения ЕТР в НЧ на основе ЧСА и PLGA синтезировали гидрофобное 4'-О-бензилоксикарбонильное производное ЕТР, Рис. 1, (4'-O-benzoyloxycarbonyl ЕТР, ЕТР-cbz), описанное ранее в [13], посредством взаимодействия ЕТР с бензилхлорформиатом в тетрагидрофуране, продукт очищали препаративной хроматографией. Структуру ЕТР-cbz подтверждали данными элементного анализа и ЯМР-спектроскопии и исследовали *in silico* с использованием Molinspiration Cheminformatics для определения молекулярных свойств.

Получение НЧ. Наночастицы на основе ЧСА, содержащие бинарные комбинации ЛВ (PTX, ЕТР-cbz), были получены с использованием принципа технологии солюбилизации гидрофобных веществ альбумином, успешно используемой для производства препарата Abraxane® (наночастицы паклитаксела, стабилизированные альбумином, nab™-технология), одобренного в 2006 FDA для лечения метастатического рака молочной железы [14].

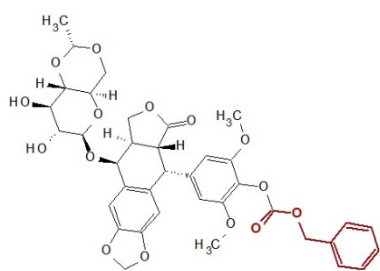


Рис. 1. Структура ETP-cbz

Навески РТХ и ЕТР-cbz в различных соотношениях (1:0, 1:1, 0:1) общей массой 60 мг растворяли в смеси 1,1 мл хлороформа и 0,1 мл 96 % этанола для получения органической фазы, которую смешивали с охлажденным до 13–14 °С 1 % водным раствором ЧСА, приготовленным путем разведения Плазбумина-20®, при этом соотношение ЛВ и ЧСА составляло 1:10. Смесь гомогенизировали, вначале используя роторный смеситель с высоким усилием сдвига Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия), а затем с помощью гомогенизатора высокого давления Microfluidizer M-110P (Microfluidics, США) при 2068 бар (30000 psi) в течение 3 мин 45 сек при охлаждении. После удаления

остаточного органического растворителя на роторном вакуумном испарителе (Laborota 4000) полученные суспензии фильтровали через фильтр 0,2 мкм, разливали во флаконы и лиофилизировали. Нагруженные РТХ и ЕТР-cbz НЧ на основе PLGA НЧ были получены методом эмульгирования под давлением с последующим удалением органического растворителя. Навеску полимера PLGA Resomer® 502H (600 мг) и ЛВ в различных соотношениях РТХ и ЕТР-cbz (1:0, 1:1, 0:1, суммарно 60 мг) растворяли в 12 мл хлористого метилена, гомогенизировали с 60 мл 1 % раствора ПВС с использованием Ultra-Turrax T18 Basic, а затем Microfluidizer M-110P при 1034 бар (15000 psi) в течение 2 мин при охлаждении. Остаточный органический растворитель удаляли под вакуумом. Добавляли криопротектор маннит (1 %) и лиофилизировали.

Изучение физико-химических параметров НЧ. Средний размер НЧ (ZaveD) и распределение по размерам (PDI), а также ζ -потенциал поверхности (ZP) определяли с помощью анализатора Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments, Великобритания). Содержание ЕТР-benz и РТХ в НЧ определяли методом ВЭЖХ (LC-20, Shimadzu, Япония). В случае НЧ на основе ЧСА лиофилизат разбавляли MeOH, обрабатывали УЗ, центрифугировали (15000 g; 10 мин) и анализировали супернатант (метод а, таблица 1). В случае PLGA НЧ в лиофилизат добавляли АЦН, диспергировали УЗ до однородного состояния, центрифугировали (15000 g; 20 мин, 20 °С), супернатант разбавляли в 10 раз АЦН и анализировали методом ВЭЖХ (метод а, таблица 1). Для определения содержания ЧСА в образцах НЧ лиофилизат восстанавливали 0,9 % раствором натрия хлорида, разбавляли в 20 раз и анализировали методом ВЭЖХ (метод б, таблица 1). Содержание PLGA определяли методом капиллярного электрофореза как описано в [15] (КЭ, Капель 105М, Люмэкс, Россия). Степень включения (СВ, %) ЕТР-benz, РТХ в PLGA НЧ определяли путем отделения НЧ центрифугированием (48254 g, 30 мин, 18 °С) с последующим анализом содержания в супернатанте методом ВЭЖХ (метод а, таблица 1); нагрузку (%) рассчитывали как отношение СВ% к соотношению PLGA:ЛВ. Концентрацию дезинтеграции, C_{desint} НЧ на основе ЧСА в 0,9 % растворе хлорида натрия при 25 °С и среде DMEM при 37 °С определяли методом динамического лазерного светорассеивания по появлению фракции 7–10 нм (по объему) после серийного разведения наносуспензии.

Изучение превращения ЕТР-cbz в ЕТР в модельной среде. Для подтверждения превращения ЕТР-cbz в ЕТР, навеску субстанции ЕТР-cbz растворяли в 25 мл модельной среды (0,05 М фосфатный буфер при pH 7,4 с добавлением 1 % Tween® 80), не содержащей или содержащей эстеразу при молярном соотношении 1:4, инкубировали при 37 °С 200 об/мин (шейкер-инкубатор ES-20, Biosan). Через установленные интервалы (0, 2, 4, 6, 8, 24 и 48 ч) отбирали 1,5 мл (без замены среды), центрифугировали (48254 g, 30 мин, 18 °С), отбирали супернатант 0,5 мл и измеряли содержание ЕТР и ЕТР-cbz методом ВЭЖХ (метод в, таблица 1). Определяли % свободного ЕТР-cbz и % ЕТР-cbz, перешедшего в ЕТР через концентрацию ЕТР в среде. В случае НЧ на основе ЧСА для изучения конверсии ЕТР-cbz в cbz в присутствии и отсутствии эстеразы использовали аналогичную методику, однако при инкубации суспензии НЧ отбирали 3 мл приемной среды, центрифугировали и 1 мл супернатанта лиофильно высушивали. Далее лиофилизат растворяли в 1 мл метанола на УЗ-бане, центрифугировали (48254 g, 10 мин, 18 °С) для осаждения альбумина, и 500 мкл супернатанта отбирали для анализа методом ВЭЖХ (метод в, таблица 1).

Таблица 1. Параметры ВЭЖХ анализа для определения РТХ, ЕТР, ЕТР-cbz, ЧСА в НЧ

Хроматографическая колонка:	Метод а	Метод б	Метод в
	Partisphere TAC-1 PFP 265x4,6 мм, 5 мкм зернение	TSKgel G3000SWXL 300x7,8 мм, 5 мкм зернение	Kromasil 100-5-C18 150x4,6 мм, 5 мкм зернение
Длина волны детектирования:	228 нм (Ртх); 285 нм (ЕТР, ЕТР-cbz)	228 нм (ЧСА)	285 нм (Етр, Етр-Вз)
Температура анализа:	30° С	25° С	40° С
Подвижная фаза (ПФ)	А – H ₂ O, В – CH ₃ CN А: В = 55 : 45 (об. %) изократический режим	0,1 М К ₂ НРO ₄ , pH 7 изократический режим	А – Et ₃ N : HCOOH : H ₂ O = 1 : 1 : 998 (об.) В – Et ₃ N : HCOOH : CH ₃ CN = 1 : 1 : 998 (об.) градиентный режим: 0–7 мин: А 75 % 7–23 мин: А 75 % → 27 % 23–25 мин: А 27 % → 75 % 25–40 мин: А 75 %
Объём ввода пробы – 10 мкл, скорость потока ПФ – 1 мл/мин			

Изучение профиля высвобождения ЕТР-cbz и РТХ из НЧ на основе PLGA. Скорость высвобождения РТХ и ЕТР-cbz из PLGA НЧ изучали в модельной среде методом центрифугирования (без смены среды), а также методом диализа с последующим анализом содержания методом ВЭЖХ (метод а, таблица 1). Во втором случае содержимое 1 флакона ресуспендировали в 1,0 мл воды очищенной, 1,0 мл суспензии НЧ помещали в диализный мешок (предел отсечения – 10 кДа, материал – регенерированная целлюлоза, Float-A Lyzer, Spectra/Por®, США), помещали в приемную среду и инкубировали при 37 °С, 200 об/мин (шейкер-инкубатор ES-20, Biosan). Через установленные интервалы (1, 2, 4, 6 и 24 ч) отбирали по 1 мл пробы с заменой на приёмную среду анализировали.

Исследование цитотоксической активности *in vitro* (MTS-тест). MTS-тест выполняли согласно стандартному протоколу с модификациями Protocol TB245, Promega). В работе использовали CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent PROMEGA, США. Клетки мышинной глиомы GL261 высаживали в 96-луночные планшеты (Corning, США) по 4×10³ клеток в 100 мкл культуральной среды (DMEM с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки) за 48 ч до начала эксперимента. В части лунок культуральную среду заменяли на среду с образцами НЧ (0,625–160 мкМ в пересчете на ЛВ). В контрольные лунки к клеткам вносили 100 мкл среды. Через 48 ч инкубации определяли количество жизнеспособных клеток (%) с помощью MTS-теста (%), оптическую плотность измеряли на планшетном анализаторе Perkin Elmer Enspire, США (λ=490 нм).

Индекс взаимодействия (CI) РТХ и ЕТР-cbz, включенных в системы доставки на основе ЧСА и PLGA, рассчитывали по формуле: $CI = C_{РТХ} / IC50_{РТХ} + C_{ЕТР-cbz} / IC50_{ЕТР-cbz}$, где $IC50_{РТХ}$ и $IC50_{ЕТР-cbz}$ – IC50 для моно-формы РТХ и ЕТР-cbz, соответственно, мкМ; $C_{РТХ}$ и $C_{ЕТР-cbz}$ – IC50 для РТХ и ЕТР-cbz, соответственно, в составе системы со-доставки, мкМ. Эффект считается аддитивным при CI 0,9–1,1, синергическим при CI < 0,9, и антогонистическим при CI > 1,1.

Результаты. Ацетилирование полярных гидроксильных (фенильных) групп ЛВ бензиловым эфиром является успешной стратегией их маскировки с целью увеличения липофильности вещества и его способности проникать через клеточную мембрану [16]. Первоначально было доказано, что благодаря лабильной карбаматной связи полученное производное ЕТР-cbz превращается в ЕТР только в присутствии эстеразы (то есть является пролекарством) (Рис. 2). На основе ЧСА получены наносуспензии со средним размером частиц 100–150 нм и отрицательным потенциалом поверхности (≈ -20 мВ) (таблица 2). Показано, что деградация ЕТР-cbz в составе ЧСА НЧ в модельной среде происходит также только в присутствии эстеразы, причем зависит от концентрации Етр-cbz (конверсия за 24 ч 100 % и 27 % при концентрациях 100 мкг/мл и 20 мкг/мл, соответственно). Интересно, что при указанных разведениях суспензии 70 % и 85 % от включенного ЕТР-cbz, соответственно, уже находится в растворе в комплексе с ЧСА, хотя при этом еще не происходит полного распада НЧ. Наноразмерные формы на основе PLGA (таблица 3) характеризуются размером частиц 90–100 нм, отрицательным потенциалом поверхности, большой степенью включения и нагрузки обоих ЛВ и высоким выходом синтеза (около 80 % по ЛВ).

Скорость высвобождения РТХ и ЕТР-cbz из PLGA НЧ в модельной среде исследовали методом диализа и путем отделения НЧ центрифугированием, данные приведены на Рис. 3. Цитотоксичность наноразмерных форм *in vitro* исследована на культуре клеток злокачественной мышинной глиомы GL261 (таблица 4).

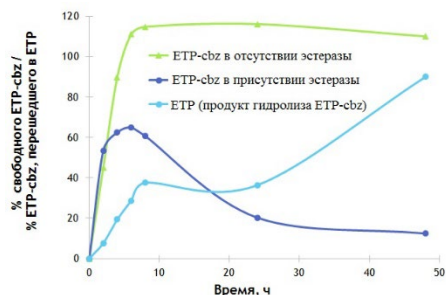


Рис. 2. Превращение ЕТР-cbz в ЕТР в отсутствие и в присутствии эстеразы

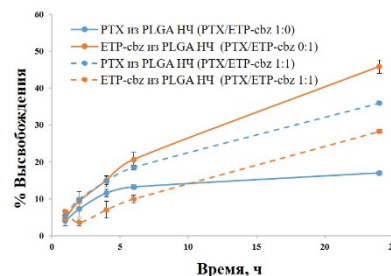


Рис. 3. Профиль высвобождения ЛВ из PLGA-НЧ, (диализ через мембрану)

Таблица 2. Физико-химические параметры ЧСА НЧ, нагруженных РТХ и ЕТР-cbz (n=3, среднее $\pm$ sd)

РТХ / ЕТР-cbz	ZaveD, нм	PDI	ZP, мВ	ЧСА, мг/мл	ЛВ, мг/мл		C _{desint} , мг/мл	
					РТХ	ЕТР-cbz	0,9 % NaCl, +25 °C	DMEM, +37 °C
1:0	131,2 $\pm$ 0,7	0,166 $\pm$ 0,012	-20,5 $\pm$ 0,6	18,7 $\pm$ 0,3	2,08 $\pm$ 0,3	-	20,0 $\pm$ 5,7	20,1 $\pm$ 3,8
1:1	129,3 $\pm$ 0,1	0,134 $\pm$ 0,015	-24,4 $\pm$ 0,2	18,2 $\pm$ 0,1	0,80 $\pm$ 0,1	0,95 $\pm$ 0,2	8,1 $\pm$ 1,5	14,0 $\pm$ 1,4
0:1	133,0 $\pm$ 2,8	0,199 $\pm$ 0,008	-22,5 $\pm$ 0,9	18,4 $\pm$ 0,4	-	1,70 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 1,2	7,5 $\pm$ 0,7

Таблица 3. Физико-химические параметры PLGA НЧ, нагруженных РТХ и ЕТР-cbz (n=3, среднее $\pm$ sd)

РТХ / ЕТР-cbz	ZaveD, нм	PDI	ZP, мВ	CB, %		Нагрузка, %	
				РТХ	ЕТР-cbz	РТХ	ЕТР-cbz
1:0	101,6 $\pm$ 0,5	0,221 $\pm$ 0,001	-20,1 $\pm$ 3,8	80,7 $\pm$ 1,1	-	7,4 $\pm$ 0,2	-
1:1	91,8 $\pm$ 0,4	0,139 $\pm$ 0,014	-32,5 $\pm$ 2,1	86,1 $\pm$ 0,5	87,5 $\pm$ 1,2	3,0 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,1
0:1	101,0 $\pm$ 5,8	0,173 $\pm$ 0,046	-27,9 $\pm$ 0,4	-	78,9 $\pm$ 0,6	-	7,5 $\pm$ 0,3

Таблица 4. Цитотоксическая активность (IC₅₀, мкМ) РТХ и ЕТР-cbz в составе ЧСА НЧ *in vitro*

Тип носителя	ЧСА			PLGA		
PTX / ETP-cbz	1:0	1:1	0:1	1:0	1:1	0:1
IC50, мкМ n=9, среднее ± sd	74,0 ± 2,3	8,3 ± 0,4 CI = 0,53	9,4 ± 2,6	61,0 ± 3,8	7,1 ± 1,8 CI = 0,37	11,4 ± 1,3

Дискуссия. В отличие от ЕТР, производное (ЕТР-cbz) эффективно включается в PLGA НЧ и легко образует наносuspension с молекулами ЧСА, что, скорее всего, объясняется его более высокой липофильностью и увеличением количества осей вращения молекулы. Размер НЧ на основе ЧСА, содержащих РТХ, составлял $\sim$ 130 нм, а размер полилактидных НЧ был несколько меньше – $\sim$ 100 нм (таблица 2). При исследовании кинетики высвобождения РТХ и ЕТР из полимерных наноразмерных форм в основном используют метод диализа [6, 7, 11, 17]. В данном исследовании при использовании диализа было выявлено замедленное высвобождение РТХ и ЕТР-cbz из PLGA НЧ (Рис. 3) – первоначальное высвобождение составляло $\approx$ 15–20 % и выросло до 45 % за 24 ч. В то же время, несмотря на достаточно высокое включение ЛВ в PLGA НЧ в случае двойной нагрузки, при отделении НЧ методом центрифугирования замечен значительный «burst-эффект» – высвобождение веществ из носителя в модельной среде происходило сразу на 65–75 % и практически полностью уже через 2 часа, что может свидетельствовать о преимущественно поверхностной локализации ЛВ на поверхности НЧ (данные не приведены). Отличие профиля высвобождения в случае диализа можно объяснить значительной сорбцией части ЛВ на мембране диализного мешка ($\approx$ 20 % в случае НЧ, содержащих бинарную композицию) и ограниченной диффузией РТХ и ЕТР-cbz через мембрану.

Полученные системы со-доставки на основе ЧСА и PLGA продемонстрировали больший цитотоксический эффект на культуре клеток мышинной глиомы GL261 (таблица 4) по сравнению с формами, содержащими одно ЛВ; при этом рассчитанные значения CI (combination index) для обоих типов носителей были $< 0,9$, что предполагает синергию между РТХ и ЕТР-cbz в составе НЧ. В случае моноформ следует отметить более высокую цитотоксичность наноразмерных форм ЕТР-cbz по сравнению с наноформами РТХ.

Заключение. Таким образом, были получены наноразмерные системы со-доставки, содержащие РТХ и гидрофобное производное этопозида (ЕТР-cbz) на основе ЧСА и PLGA, и определены их основные физико-химические параметры и профиль высвобождения ЛВ. Сравнительное исследование цитотоксичности *in vitro* на культуре клеток мышинной глиомы GL261 продемонстрировало синергический эффект между РТХ и ЕТР-cbz в составе наноразмерных форм обоих типов. Таким образом, применение систем со-доставки РТХ и ЕТР-cbz для химиотерапии злокачественных глиом представляется перспективным и заслуживает дальнейшего изучения.

Авторы выражают благодарность сотруднику РХТУ им. Д.И. Менделеева Мантрову Сергею Николаевичу за синтез 4' – О-бензилоксикарбонильного производного этопозида и компаниям Evonik Nutrition & Care GmbH и CPH Pharma b.v. за предоставленный образец полимера PLGA Resomer® 502H.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075–15–2020–792 (Уникальный идентификатор RF-190220X0031).

Литература

1. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *A Cancer Journal of Clinicians*. 2021; 71(3): 209–249.
2. Zeinali M. et al. Nanovehicles for co-delivery of anticancer agents // *Drug Discovery Today*. – 2020.
3. Pan J. et al. Polymeric co-delivery systems in cancer treatment: An overview on component drugs' dosage ratio effect // *Molecules*. 2019; 24(6):1035.
4. Afsharzadeh M. et al. Recent advances in co-delivery systems based on polymeric nanoparticle for cancer treatment // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018; 46(6): 1095–1110.
5. Maleki H. et al. Effect of Paclitaxel/etoposide co-loaded polymeric nanoparticles on tumor size and survival rate in a rat model of glioblastoma // *International journal of pharmaceutics*. 2021; 604:120722.
6. Wang B. et al. Paclitaxel and etoposide co-loaded polymeric nanoparticles for the effective combination therapy against human osteosarcoma // *Journal of nanobiotechnology*. 2015; 13(1):1–11.
7. Duan R. et al. Polymer–lipid hybrid nanoparticles-based paclitaxel and etoposide combinations for the synergistic anticancer efficacy in osteosarcoma // *Colloids and surfaces b: biointerfaces*. 2017; 159: 880–887.
8. Huang T. et al. Synergistic increase in the sensitivity of osteosarcoma cells to thermochemotherapy with combination of paclitaxel and etoposide // *Molecular medicine reports*. 2012; 6(5):1013–1017.
9. Weaver B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // *Mol Biol Cell*. 2014; 25(18): P.2677–2681.
10. Montecucco A. et al. Molecular mechanisms of etoposide // *EXCLI Journal*. 2015; (14): 95–108.
11. Xu Y. et al. The synergic antitumor effects of paclitaxel and temozolomide co-loaded in mPEG-PLGA nanoparticles on glioblastoma cells // *Oncotarget*. 2016; 7(15): 20890.
12. Luiz M.T. et al. Highlights in targeted nanoparticles as a delivery strategy for glioma treatment // *International Journal of Pharmaceutics*. 2021; 120758.
13. Ohnuma T. et al. Preparation and Antitumor Activity of 2'' – O-, 3'' – O-and 2'', 3'' – Di-O-substituted Derivatives of Etoposide // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1992; 40(7): 1783–1788.
14. Neil I. Nab technology: a drug delivery platform utilizing endothelial gp60 receptor-based transport and tumor-derived SPARC for targeting // *Drug Deliv. Rep*. 2007; 37–41.
15. Kumskova N. et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release // *Journal of microencapsulation*. 2020; 37(3): 283–295.
16. Leu Y.L. et al. Benzyl ether-linked glucuronide derivative of 10-hydroxycamptothecin designed for selective camptothecin-based anticancer therapy // *Journal of medicinal chemistry*. 2008; 51(6): 1740–1746.
17. Maleki H. et al. Preparation of Paclitaxel and Etoposide Co-loaded mPEG-PLGA Nanoparticles: an Investigation with Artificial Neural Network // *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2019; 1–15.