

Original Article**Development of polymeric micelles loaded with STAT3 inhibitory, Stattic, for cancer treatment**

Hamed Masoumzadeh¹, Nasrin Hoseinzad¹, Sevda Jafari¹, Ali Shayanfar², Ommoleila Molavi^{1,4,5*},
Haleh Vaez³

¹Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

⁵Molecular Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 15 Dec 2019

Accepted: 4 Feb 2020

ePublished: 15 Sep 2021

Keywords:

STAT3 inhibitor;
Nanoparticle; Cancer;
Stattic

Abstract

Background: STAT3 is an oncogenic signaling pathway found constitutively active in many types of human malignancies and plays a key role in cancer progression. Stattic is a small molecule, which selectively inhibits the SH2 domain of STAT3. In most studies, stattic has been proposed as a promising strategy STAT3 inhibition in cancer cells harboring constitutively active STAT3. However, the lack of proper formulation due to the poor water solubility and low bioavailability of stattic is a major limitation for its usage in the clinic. This project aimed to develop poly(ethylene glycol)-block-poly(caprolactone) (PEG-*b*-PCL)-based polymeric micelles loaded with stattic and evaluate drug encapsulation efficiency and release in the developed formulations.

Methods: In this experimental study, to prepare stattic loaded micellar formulations, the co-solvent evaporation method was used. The mean diameter and polydispersity index (PDI) of micelles were defined by the light scattering method. Encapsulated drug levels were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). Data were analyzed using GraphPad Prism software through one-way ANOVA.

Results: Stattic was loaded in the polymeric micelles with encapsulation efficiency ranging from 40% to 73%. Drug loaded micelles were measured between 90 to 130 nm in size. PDI was obtained 0.3-1, and encapsulation of stattic in Polyethylene glycol-block-poly (α -benzyl carboxylate ϵ -caprolactone (PEG-*b*-PBCL) micellar formulation resulted in a more than 6-fold increase in the water solubility of stattic (0.36 vs. 0.06 mg/mL). Regarding high encapsulation efficiency, two micellar formulations were selected for further analysis in that both of them released 70-80% of the drug within the first hour, indicating burst release of the drug.

Conclusion: These findings show that PEG-*b*-PBCL copolymers can be a suitable vehicle for the solubilization of stattic.

Masoumzadeh H, Hoseinzad N, Jafari S, Shayanfar A, Molavi OL, Vaez H. Development of polymeric micelles loaded with STAT3 inhibitory, Stattic, for cancer treatment. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2021;43(4):335-345. Persian.

*Corresponding author; E-mail: molavio@tbzmed.ac.ir

©2021 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

STAT3 is a cancer signaling pathway that is activated in different types of human cancers. Constitutive activation of STAT3 plays major role in tumor growth, resistance to apoptosis and immune invasion by cancer cells. Stattic is a small molecule, which selectively binds to SH2 domain of STAT3 thereby suppresses the dimerization and activation of STAT3. In most of the studies, stattic has been proposed as a useful tool to inhibit STAT3 activity in cancer cells harboring constitutively active STAT3. Despite the anti-cancer effects of stattic, this compound has limited clinical use due to its low water solubility and bioavailability. Therefore, the development of a suitable formulation for stattic is a fundamental. The aim of this project was to develop poly(ethylene glycole)-block-poly(caprolactone) (PEG-*b*-PCL)-based polymeric micelles loaded with stattic and evaluate drug encapsulation efficiency and release in the developed formulations.

Methods

In this experimental study, PEG-*b*-PCL and Polyethylene glycol-block-poly(α -benzyl carboxylate ϵ -caprolactone(PEG-*b*-PBCL) copolymers were prepared by open-loop polymerization of caprolactone (CL) and benzyl-carboxylate-caprolactone (BCL). Polyethylene glycol and stannous octate were used as initiator and catalysts, respectively. To prepare stattic loaded micellar formulations, co-solvent evaporation method was used. Overallly, four formulations including PEG₅₀₀₀-*b*-PCL₁₄₀₀₀, PEG₅₀₀₀-*b*-PCL₁₀₀₀₀, PEG₅₀₀₀-*b*-PCL₅₀₀₀ and

PEG₅₀₀₀-*b*-PBCL₅₀₀₀ were prepared. Mean diameter and polydispersity index (PDI) of micelles were defined by light scattering method. Encapsulated drug levels were measured using high performance liquid chromatography (HPLC). The drug release study was performed by dialysis using spectral dialysis bag (12000-14000 g / mol). Sample solution were collected at different time points and stored at -22 ° C for HPLC analysis. In this study, each experiment was performed in three replications and the data were shown as mean \pm standard deviation. MTT data were analyzed using Graph pad prism software through one-way ANOVA analysis of variance. P-value less than 0.05 was considered as a significant level.

Results

The loading amount of stattic in PEG-*b*-PCL and PEG-*b*-PBCL micelles was found to be between 1.5 to 7.1% (mg/mg), and the highest loading amount was related to PEG₅₀₀₀-*b*-PBCL₅₀₀₀ micelles. Stattic was loaded in the polymeric micelles with encapsulation efficiency ranging from 40 to 73%. Among the 4 polymers studied, PEG₅₀₀₀-*b*-PCL₅₀₀₀ and PEG₅₀₀₀-*b*-PBCL₅₀₀₀ showed the highest encapsulation efficiency with 64.23 and 73.77%, respectively. Drug loaded micelles were 90 to 130 nm in size with PDI being 0.3-1. The encapsulation of stattic in PEG-*b*-PBCL micellar formulation resulted in more than 6-fold increase in the water solubility of stattic (0.36 vs .006 mg/mL). Respecting to high encapsulation efficiency of PEG₅₀₀₀-*b*-PCL₅₀₀₀ and PEG₅₀₀₀-*b*-PBCL₅₀₀₀, these micellar formulations were selected for release analysis. Both formulations indicated burst release of drug by releasing 70-80% of the drug in less than 1 hour. However, 100% of the

encapsulated drug was released after 4 hours, indicating that this formulation could not provide adequate controlled release.

Conclusion

In this study, micellar formulations were designed for a poorly water soluble STAT3 inhibitory molecule, stattic. The formulations were investigated based on particle size, PDI, drug loading, encapsulation efficiency, and drug release. The results showed that among the

prepared copolymers, PEG5000-*b*-PBCL5000 micelles with 99 nm particle size and PDI of 0.31 showed acceptable formulation properties. Encapsulation of Stattic in PEG5000-*b*-PBCL5000 polymeric micelles increased the water solubility of stattic from 0.06 to 0.36 mg / ml water. These findings show that PEG-*b*-PBCL copolymers can be a suitable vehicle for solubilization of stattic, while they are not able to provide controlled release of stattic *in vitro*.

مقاله پژوهشی

توسعه میسل های پلیمری بارگذاری شده با مهارکننده STAT3، استاتیک، برای درمان سرطان

حامد معصوم زاده^۱، نسرين حسين زاده^۱، سودا جعفری^۱، علی شایان فر^۲، هاله واعظ^۳، ام لیلا مولوی^{۴*}

^۱ گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۳ گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۵ مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۳۹۸/۹/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۵
انتشار برخط: ۱۴۰۰/۶/۲۴

کلید واژه‌ها:

مهار کننده STAT3؛
نانوپارتیکل؛ سرطان؛ استاتیک

زمینه: STAT3 یک پروتئین سیگنالینگ انکوژنیک است که در بسیاری از بدخیمی‌های انسانی به طور مداوم فعال شده و یک نقش کلیدی در رشد سرطان بازی می‌کند. استاتیک، یک مولکول کوچک است که بصورت انتخابی، فعالیت زنجیره‌ی SH2 STAT3 را مهار می‌کند. در مطالعات زیادی، استاتیک به عنوان ابزاری امید بخش برای مهار STAT3 در سلول‌های توموری که فعالیت مداوم STAT3 دارند، پیشنهاد گردیده‌است. اگرچه، عدم وجود فرمولاسیون مناسب به دلیل محلولیت آبی کم و فراهمی‌زیستی پایین، محدودیت عمده برای استفاده از استاتیک در فاز بالینی آن می‌باشد. هدف از این پروژه، توسعه‌ی میسل‌های پلیمری پلی(اتیلن گلیکول)-b-پلی(ε-کاپرولاکتون) (PEG-b-PCL) بارگذاری شده با داروی استاتیک و ارزیابی بازده انکپسولاسیون و رهش دارو در فرمولاسیون های توسعه یافته بود. داده‌ها با استفاده از نرم افزار Graph pad prism و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه آنالیز شدند.

روش کار: در این مطالعه تجربی، برای تهیه‌ی فرمولاسیون‌های میسلی بارگذاری شده با استاتیک از روش تبخیر کمک حلال استفاده شد. قطر متوسط و شاخص پراکندگی (PDI) میسل‌ها توسط روش پراکندگی نور (Light scattering) تعیین شد. میزان داروی بارگیری شده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: استاتیک با بازده بارگیری بین ۴۰ تا ۷۳٪ در میسل‌های پلیمری بارگذاری شد. سایز میسل‌های بارگیری شده با دارو بین ۹۰ تا ۱۳۰ نانومتر محاسبه گردید. شاخص پراکندگی بین ۰/۳ تا ۱ بدست آمد و بارگیری استاتیک توسط میسل‌های پلی-(اتیلن گلیکول)-b-پلی(ε-کاپرولاکتون) (PEG-b-PBCL) محلولیت آبی استاتیک را به میزان ۶ برابر افزایش داد (۳۶٪/در برابر ۶٪ میلی گرم در میلی لیتر). با توجه به بازده انکپسولاسیون، دو فرمولاسیون میسلی برای آنالیزهای بیشتر انتخاب شدند که هر دو با ۷۰-۸۰٪ رهش دارو در کمتر از ۱ ساعت، رهش انفجاری از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: یافته‌ها نشان دادند که کوپلیمرهای PEG-b-PBCL ابزار مناسبی برای افزایش محلولیت استاتیک می‌باشند.

مقدمه

STAT3 (signal transducer and activator of transcription) یک مسیر سیگنالینگ متداول سرطانی است که در انواع مختلف سرطان‌های انسانی فعال می‌شود. فعالیت ذاتی STAT3 بیانگر نقش عمده و کلیدی آن در رشد تومور، مقاومت به آپوپتوز (مرگ سلولی) و تهاجم سیستم ایمنی توسط سرطان است.^{۱،۲} شواهد نشان می‌دهند که مسدود کردن فعالیت STAT3 در تومور، باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی، تقویت آپوپتوز و بهبود پاسخ‌های

ایمنی ضدسرطانی می‌شود.^۳ بدین جهت، STAT3 به عنوان یک هدف امیدوارکننده جهت درمان سرطان‌های بدخیم پیشنهاد شده‌است و طی دو دهه‌ی اخیر، راهکارهای متعددی جهت مهارکردن STAT3 مورد توجه قرار گرفته است.^{۳،۴} استاتیک یک مولکول کوچک مهار-کننده‌ی مستقیم فسفریلاسیون و دیمیریزاسیون STAT3 می‌باشد. این ترکیب به‌طور انتخابی اتصال فیزیولوژیکی پپتیدی تیروزین فسفریله‌شده را به ناحیه‌ی SH2

* نویسنده مسؤول: امیل: molavio@tbzmed.ac.ir

حق تالیف برای مولفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریپتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

نکات کاربردی

میسسل‌های PEG-b-PBCL، یک حامل قابل قبول برای تهیه نانومیسسل‌های داروی استاتیک با مقدار انکپسولاسیون مناسب هستند، که می‌توانند محلولیت آبی استاتیک را به میزان ۶ برابر افزایش دهند.

کو پلیمر پلی(اتیلن گلیکول)-b-پلی (e) کاپرولاکتون (PEG-PCL) یک کوپلیمر زیست سازگار است و تاکنون نانو حامل‌های تهیه‌شده بر پایه کوپلی‌مر PEG-PCL به صورت موفقیت‌آمیزی بمنظور افزایش محلولیت و دارورسانی کنترل شده‌ی داروهای هیدروفوب به کار برده شده‌اند.^{۱۶،۱۷} مطالعات پیشین نشان دادند که میسل‌های PEG-PCL، فارماکوکینتیک و توزیع‌زیستی (Biodistribution) داروهای سیکلوسپورین آ و هیدروکسیل کامپوتوتکین را در طول تزریق وریدی افزایش می‌دهند. علاوه بر این، کوپلیمرهای PEG-PCL به منظور دارورسانی هدفمند داروهای شیمی‌درمانی به تومورها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند.^{۱۸،۱۹} در این پژوهش، از پلیمرهای PEG-PCL جهت فرمولاسیون داروی استاتیک استفاده شده‌است و قابلیت میسل‌های تشکیل‌شده از کوپلیمر PEG-PCL در حضور و عدم حضور زنجیره جانبی بنزیل کربوکسیلات (Benzyl carboxylate) بمنظور بهبود محلولیت آبی و رهش کنترل شده استاتیک مورد ارزیابی قرار گرفته‌است.

روش کار

در مطالعه تجربی حاضر، داروی استاتیک از شرکت ابکم (انگلستان) و کوپلیمرهای پلی (اتیلن گلیکول)-b-پلی (e) - کاپرولاکتون (PEG-b-PCL) و پلی(اتیلن گلیکول)-b-پلی(α-بنزیل کربوکسیلات e- کاپرولاکتون) (PEG-b-PBCL) از موسسه‌ی Advanced Polymer Materials (کانادا) تهیه گردید. از پلی‌اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۵۰۰۰ گرم بر مول و پلی‌کاپرولاکتون با وزن مولکولی‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۴۰۰۰ گرم بر مول و پلی‌بنزیل کربوکسیلات کاپرولاکتون با وزن مولکولی ۵۰۰۰ گرم بر مول در تهیه کوپلیمرها استفاده گردید. متانول، استونیتریل و استون از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. آب مقطر دیونیزه شده در همه‌ی مراحل آزمایش استفاده شد و از شرکت دارویی شهید قاضی تبریز فراهم شد.

STAT3 مهار کرده و از دیمیرزاسیون آن جلوگیری می‌نماید. لذا بدین طریق فعالیت STAT3 و جایگیری آن در هسته را مهار کرده و مرگ سلولی را در رده‌های سرطانی وابسته به STAT3 القا می‌کند.^۵ استاتیک به عنوان یک ابزار سودمند جهت مهار فعالیت STAT3 در سلول‌های سرطانی و مدل‌های توموری، معرفی می‌شود. علی‌رغم تأثیرات ضد سرطانی داروی استاتیک، این ترکیب به دلیل محلولیت بسیار پایین در آب و فراهمی‌زیستی پایین دارای مصرف بالینی محدودی می‌باشد. لذا توسعه فرمولاسیون مناسب برای این مولکول مهارکننده‌ی STAT3، یک قدم اساسی و مهم برای استفاده‌ی بالینی این دارو است که می‌تواند نویدبخش بهبود بدخیمی‌های ناشی از بیش‌فعالی STAT3 باشد. استفاده از نانو حامل‌های پلیمری یکی از مهمترین استراتژی‌های به کار رفته جهت بهبود محلولیت و دارورسانی هدفمند داروهای با محلولیت آبی کم می‌باشد.^۶ نانو میسل‌ها یکی از پرکاربردترین حامل‌های دارورسانی برای داروهای ضدسرطانی بشمار می‌آیند. میسل‌های کوپلیمری طی فرایند خودآرایی پلیمرهای آمفیفیلک در محلول‌های آبی شکل می‌گیرند به طوریکه انتهای غیر قطبی پلیمر آمفیفیلک در مرکز و قسمت قطبی آن به سمت بیرون قرار می‌گیرد.^۷ افزایش حلالیت داروهای کم محلول به وسیله میسل‌های پلیمری از طریق به دام افتادن دارو در درون هسته هیدروفوب میسل اتفاق می‌افتد.^۸ مطالعات گذشته نشان داده‌اند که میسل‌های پلیمری بخوبی محلولیت آبی داروهای کم محلول را افزایش می‌دهند.^{۹،۱۰} میسل‌های پلیمری می‌توانند از طریق بهبود اثرات نفوذ پذیری و ماندگاری (EPR Effect)، هدف‌رسانی غیر فعال داروی بارگذاری‌شده را به تومور فراهم سازند.^{۱۱،۱۲} میسل‌هایی با سایز ۲۰-۲۰۰ نانومتر که با داروی ضد سرطانی بارگذاری می‌شوند، به دلیل بالا بودن نفوذ پذیری رگ‌های توموری، قادر هستند به داخل سلول توموری نفوذ کرده و به دلیل نقصان سیستم لنفاوی تومور، در داخل تومور به دام بیافتند.^{۱۳} با وجوداینکه نانو حامل‌های میسلی به وفور در دارورسانی ترکیب‌های هیدروفوب مطالعه شده‌اند، اما تاکنون تعداد اندکی از فرمولاسیون‌ها با پایه میسلی برای کاربردهای بالینی مورد تایید قرار گرفته‌اند.^{۱۴} نکته کلیدی در موفقیت فرمولاسیون‌های میسلی، یافتن ترکیب مناسب دارو و پلیمر است که می‌تواند در حفظ یکپارچگی فرمولاسیون در شرایط بیولوژیک نقش داشته و باعث ایجاد یک پروفایل رهاسازی مناسب از دارو گردد.^{۱۵}

مقدار داروی انکپسوله شده با استفاده از روش HPLC اندازه‌گیری شد. مقادیر داروی انکپسوله شده جهت محاسبه‌ی میزان بارگذاری دارو و کارایی انکپسولاسیون بر اساس معادلات زیر، مورد استفاده قرار گرفتند.

$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی انکپسوله شده (میلی گرم)}}{\text{مقدار پلیمر استفاده شده (میلی گرم)}} = (\%) \text{ داروی بارگذاری شده}$$

$$100 \times \frac{\text{مقدار داروی انکپسوله شده (میلی گرم)}}{\text{مقدار کل داروی استفاده شده (میلی گرم)}} = (\%) \text{ بازده انکپسولاسیون}$$

سیستم HPLC مربوط به کارخانه واترز آمریکا مجهز به آشکارساز یو وی و فاز ساکن از ستون یوروسفر C18 با پیش ستون مربوط به کارخانه کنور آلمان بود. فاز متحرک از ۶۰٪ استونیتریل و ۴۰٪ آب تشکیل شده بود که این روش در مطالعه قبلی برای اولین بار توسعه یافته و ارائه شد.^{۲۲} سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق برابر با ۲۰ میکرولیتر بود. تزریق نمونه‌ها توسط دستگاه اتوسمپلر انجام شد. استاتیک توسط آشکارساز یو وی در ۲۱۵ نانومتر شناسایی شد. آزمایش در دمای اتاق انجام شد و منحنی کالیبراسیون در محدوده‌ی ۲/۵ تا ۴۰ میکروگرم در میلی لیتر برای استاتیک رسم گردید.

مطالعه‌ی رهش دارو در محیط آزمایشگاهی: مطالعه‌ی رهش دارو توسط روش دیالیز و با استفاده از ۲ میلی لیتر از هر فرمولاسیون میسل به انجام رسید و در کیسه دیالیز طیف قرار داده شد (۱۲۰۰۰-۱۴۰۰۰ گرم بر مول). کیسه‌های دیالیز با پنس کاملاً بسته شدند و در یک بشر حاوی ۲۰۰ میلی لیتر بافر سالین فسفات با pH برابر با ۷/۴ قرار داده شدند. سپس، کل سیستم در دمای اتاق در همزن واقع شدند. در نقاط مختلف زمانی، ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ی محلول‌ها از کیسه‌ی دیالیز برداشته شده و به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شدند و در دمای منفی ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا توسط HPLC آنالیز شوند. بعد از هر مرحله نمونه‌برداری برای عدم تغییر حجم بافر، معادل حجمی از بافر تازه جایگزین شد.

آنالیز آماری: در این مطالعه، هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شدند. آنالیز معنی‌دار بودن اختلاف میان داده‌ها از طریق آنالیز آماری واریانس یک طرفه براساس روش Student-Newman-Keuls post hoc با استفاده از نرم افزار

آماده سازی سیستم های میسلی-کوپلیمری: کوپلیمر های PEG-b-PCL و PEG-b-PBCL طبق روش ارایه شده در مطالعات پیشین آماده گردید.^{۲۰،۲۱} کوپلیمرهای PEG-b-PCL و PEG-b-PBCL به ترتیب از طریق پلیمریزاسیون حلقه باز کاپرولاکتون (CL) و بنزیل کربوکسیلات-کاپرولاکتون (BCL) با استفاده از پلی اتیلن گلیکول به عنوان آغاز کننده و استئانوس اوکتات (stannous octoate) به عنوان کاتالیزور تهیه شدند. به طور خلاصه، پلی اتیلن گلیکول، کاپرولاکتون و بنزیل کربوکسیلات-کاپرولاکتون به آمپول ۱۰ میلی لیتری که قبلاً تحت شرایط خلا هواگیری شده بود اضافه شدند و واکنش پلیمریزاسیون به مدت ۴ ساعت در دمای ۱۴۰ سانتی‌گراد در داخل آن انجام گرفت.

آماده‌سازی محلول استوک استاتیک: ۱۰ میلی گرم استاتیک در ۵/۰ میلی لیتر استون حل شد و غلظت ۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان محلول استوک ایجاد شد. چون از پایداری دارو در استون اطلاعاتی در دسترس نبود، محلول استوک جدید هر هفته تهیه شده و در دمای منفی ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

بارگذاری استاتیک در فرمولاسیون‌های میسلی: استاتیک بارگذاری شده در فرمولاسیون‌های میسلی توسط روش تبخیر کمک‌حلال تهیه گردید. به‌طور خلاصه، ۲۰ میلی گرم از پلیمر در ۵۰۰ میکرولیتر استون حل شد. سپس، ۵۰ میکرولیتر از محلول استوک به آن اضافه شد. پس از اینکه حجم آن به ۳۰۰ میکرولیتر رسید، فاز آلی شامل دارو و پلیمر، قطره قطره به ۲ میلی لیتر آب اضافه گردید. بعد از ۴ ساعت تکان دادن در دمای اتاق، استون باقی‌مانده توسط خلا خارج شده و محلول آبی فرمولاسیون میسلی در دور ۶۰۰ rpm به مدت ۶ دقیقه، برای خارج‌سازی استاتیک آزاد، سانتریفیوژ شد.

تعیین اندازه‌ی ذرات: قطر متوسط و شاخص پراکندگی (PDI) میسل‌ها، توسط پراش نور تعیین شدند (HAS ۳۰۰۰).

تعیین بازده انکپسولاسیون: برای تعیین میزان انکپسولاسیون استاتیک، محلول آبی میسل‌های پلیمری در ۶۰۰ rpm به مدت ۶ دقیقه، سانتریفیوژ شد تا میسل‌های آزاد و گنجانده شده‌ی دارو، آزاد شود. سپس، ۵۰ میکرولیتر از محلول میسلی با متانول به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد تا ساختار میسلی به هم بریزد و داروی گنجانده شده آزاد شود.

پراکندگی ذرات از لحاظ سایز در یک نمونه است. مقادیر عددی شاخص پراکندگی مابین صفر تا یک تعریف می-شود که صفر نشان دهنده یکنواختی بالای نمونه از نظر سایز ذرات می-باشد و عدد یک نشان دهنده ی حضور جمعیت با سایز ذرات متفاوت در نمونه است.

انتشار استاتیک از فرمولاسیون میسل پلیمری در شرایط آزمایشگاهی

با توجه به بازده انکپسولاسیون قابل توجه مشاهده شده در $PEG_{5000}-b-PCL_{5000}$ و $PEO_{5000}-b-PBCL_{5000}$ ، این دو فرمولاسیون برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شدند. نمودار رهش استاتیک در غیاب پلیمرها و در حضور فرمولاسیون میسلی در شکل های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. هر دو فرمولاسیون، ۷۰-۸۰ درصد دارو را در کمتر از ۱ ساعت آزاد کردند که در مقایسه با داروی استاتیک در غیاب پلیمر که تمامی دارو را بعد از یک ساعت آزاد می-کرد نتایج بهتری را حاصل می-کند. با این حال ۱۰٪ از داروی کیسوله شده پس از ۴ ساعت آزاد شد که نشان می-دهد فرمولاسیون ایجاد شده نمی-تواند رهش کنترل شده مناسبی بعد از ۴ ساعت را فراهم کند.

Graph pad prism انجام گردید. از لحاظ آماری، ارزش پی کوچکتر از ۰/۰۵ ($P\text{-value} \leq 0/05$) به عنوان سطح معنی-دار در نظر گرفته شد.

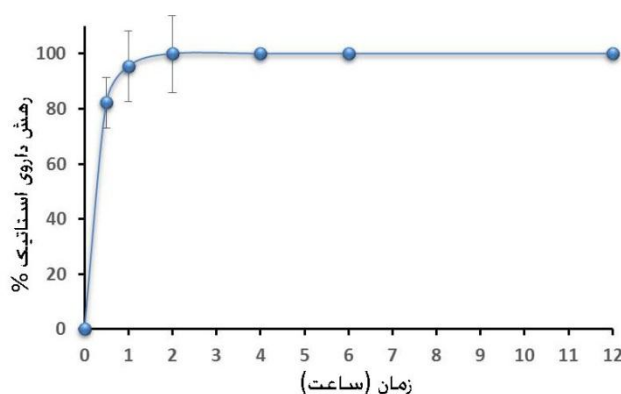
یافته‌ها

کیسوله کردن استاتیک در میسل های پلیمری

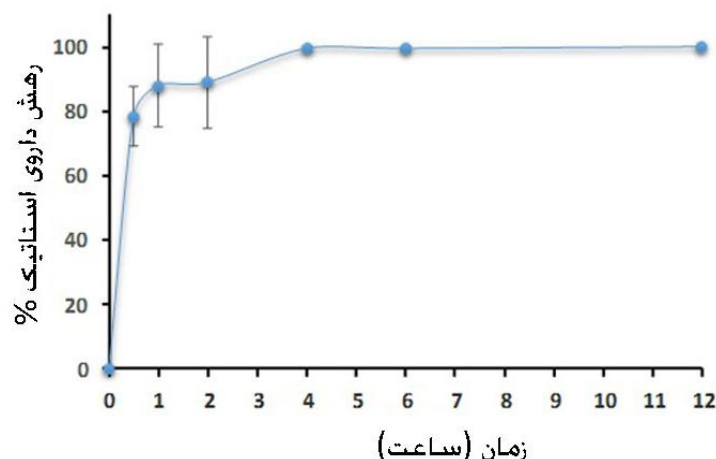
جدول ۱ ویژگی های داروی استاتیک بارگذاری شده در میسل های پلیمری $PEG-b-PCL$ و $PEG-b-PBCL$ را نشان می-دهد. میزان بارگذاری بین ۲/۵ تا ۳/۲ درصد بدست آمد که بالاترین بارگذاری مربوط به کوپلیمر $PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$ می-باشد. در بین ۴ پلیمر بررسی شده، $PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$ بالاترین بازده انکپسولاسیون با میزان ۷۳/۷۷ درصد را نشان داد. همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است، در بین فرمولاسیون میسل های توسعه یافته، اندازه ذره های نانوذرات پلیمری تهیه شده در یک رنج و بین ۹۹ تا ۱۳۰ نانومتر بدست آمد. در این مطالعه، میسل $PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$ کمترین شاخص پراکندگی را نشان داد که مقدار آن ۰/۳۱ بود (جدول ۱). شاخص پراکندگی اساساً "نماینگر نحوه ی

جدول ۱: ویژگی های استاتیک بارگذاری شده در میسل های پلیمری $PEG-b-PCL$ و $PEG-b-PBCL$

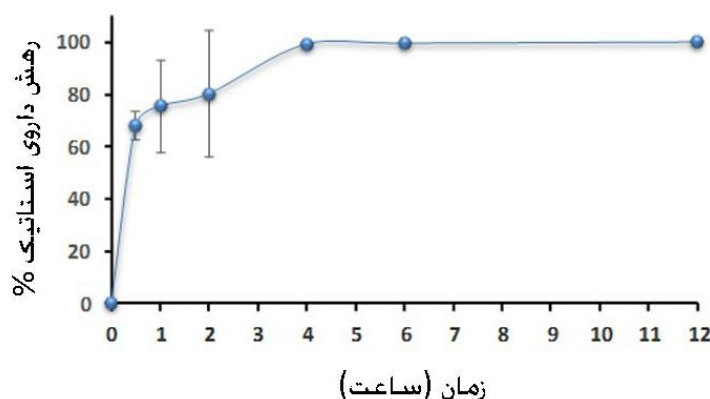
کوپلیمر	میزان بارگذاری استاتیک (%)	بازده انکپسولاسیون (%)	اندازه ذره ای (نانومتر)	شاخص پراکندگی
$PEG_{5000}-b-PCL_{14000}$	$2 \pm 0/1$	$40/43 \pm 2/15$	$107/07 \pm 18/31$	$0/633 \pm 0/097$
$PEG_{5000}-b-PCL_{1000}$	$2/5 \pm 0/1$	$51/01 \pm 3/606$	$127/8 \pm 2/25$	۱
$PEG_{5000}-b-PCL_{5000}$	$3/2 \pm 0/4$	$64/23 \pm 8/71$	$130/63 \pm 4/0$	$0/603 \pm 0/145$
$PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$	$3/6 \pm 0/4$	$73/77 \pm 8/38$	$99/05 \pm 54/22$	$0/310 \pm 0/103$



شکل ۱: نمودار رهش استاتیک در غیاب پلیمر در PBS در دمای اتاق (pH= ۷/۴)



شکل ۲: نمودار رهش استاتیک بارگذاری شده در PEG₅₀₀₀-b-PCL₅₀₀₀ در PBS، در دمای اتاق (pH= ۷/۴)



شکل ۳: نمودار رهش استاتیک در PEG₅₀₀₀-b-PBCL₅₀₀₀ در PBS، در دمای اتاق (pH= ۷/۴)

بحث

کند. برخلاف STAT3، STAT1 ژنهای مهارکنندهی تکثیر و طرفدار آپوپتوز را القا می‌کند که بطور مستقیم رشد تومور را مهار می‌کنند.^{۲۴}

در حالی که در مطالعات زیادی اهمیت و اثر مهار STAT3 ناشی از استاتیک گزارش شده است، کاربرد بالینی این مادهی ضد سرطان به دلیل محلولیت ضعیف در آب محدود بوده است. در این پروژه با هدف انکپسوله کردن این دارو در میسل‌های کوپلیمری بر مبنای PEG-PCL، رهش داروی استاتیک در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده شد. در بین کوپلیمرهای مورد مطالعه، میسل PEG-b-PBCL بالاترین بازده کپسوله سازی را برای استاتیک نشان داد که نتیجهی حاصل می‌تواند مربوط به ساختار شیمیایی میسل باشد، زیرا انتظار می‌رود حضور

از آنجا که STAT3 در بسیاری از انواع بدخیمی‌های انسان فعال است و نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد، مهار STAT3 یک استراتژی نوید بخش برای درمان سرطان محسوب می‌شود.^۹ در میان چندین مهارکننده STAT3 که در طی دو دهه اخیر معرفی شده‌اند، مهارکننده‌هایی با مولکول کوچک به دلیل عملکرد انتخابی و قدرت بالا در مقایسه با سایر عوامل بازدارنده، مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند.^{۲۳} استاتیک، مولکولی کوچک است که به طور انتخابی مانع از فعال شدن STAT3 می‌شود که منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی حامل فرم فعال STAT3 می‌گردد. یکی دیگر از مزایای استاتیک نسبت به سایر مولکولهای مهارکننده STAT3 این است که STAT1، عضو دیگر خانواده STAT را سرکوب نمی‌کند.

دارو، بازده انکپسولاسیون و رهش دارو، بررسی شده‌اند. نتایج نشان داد در بین کوپلیمرهای مورد مطالعه که در این طرح استفاده شدند، میسل‌های $PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$ با اندازه ذره‌ای ۹۹ نانومتر با شاخص پراکندگی $0.31/\%$ ویژگی‌های فرمولاسیونی قابل قبولی نشان دادند. انکپسوله کردن استاتیک توسط میسل‌های پلیمری $PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$ محلولیت آبی استاتیک را از $0.6/\%$ به $0.36/\%$ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر آب افزایش داد، درحالی‌که، فرمولاسیون‌های میسل $PEG_{5000}-b-PBCL_{5000}$ قادر به ایجاد رهش کنترل‌شده و آرام استاتیک در محیط آزمایشگاه نبودند.

قدردانی

این مقاله نتیجه‌ی پایان‌نامه‌ی دکتری عمومی ح.م. با شماره پایان نامه ۳۹۰۱ می‌باشد. بدین‌وسیله از زحمات مسئولین مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز نهایت سپاس‌گزاری را داریم.

ملاحظات اخلاقی

کد اخلاق این تحقیق TBZMED.REC.1394.960 می‌باشد که در تاریخ ۱۳۹۴/۱۰/۲۸ دریافت شده است

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

منافع متقابل

مولفان اظهار می‌دارند که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

ح.م.، ن.ه.، س.ج.، ع.ش.، ه.و. و ا.م. طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی را خوانده و تایید کردند.

حلقه آروماتیک در بلوک PCL باعث افزایش هیدروفوبیسیته و سازگاری بلوک تشکیل هسته با ساختار هیدروفوب داروی استاتیک گردد.^{۲۰،۲۵} هیدروفوبیسیته و سازگاری ساختار هسته باعث بارگذاری بهتر استاتیک در ترکیب با میسل‌های $PEG-b-PBCL$ به همراه ساختار هیدروفوبیک استاتیک می‌شود. کوپلیمرهای $PEG-b-PBCL$ در مقایسه با دیگر کوپلیمرها با پایه‌ی $PEG-b-PCL$ ، غلظت میسل بحرانی (CMC) بسیار پایینی نشان می‌دهند.^{۲۰،۲۶،۲۷} غلظت میسل بحرانی، کمترین غلظت کوپلیمر مورد نیاز برای تشکیل میسل است. کوپلیمرهای مسدودکننده با HLB (تعادل هیدروفیلی-لیپوفیلی) پایین، معمولاً تمایل بیشتری به تشکیل میسل نشان می‌دهند. به بیانی دیگر، هرچه غلظت میسل بحرانی کوپلیمر کم‌تر باشد، پایداری فرمولاسیون میسل در محیط‌های بیولوژیکی بیشتر خواهد بود.^{۲۸} غلظت میسل بحرانی ذرات $PEG-b-PBCL$ $0.25/\mu M$ است که بسیار بیشتر از غلظت کوپلیمر مورد انتظار بعد از استفاده در محیط داخل بدن است (۲۹). حضور گروه‌های آروماتیک در ساختمان $PEG-b-PBCL$ منجر به ایجاد غلظت میسل بحرانی پایین در مقایسه با میسل‌های $PEG-b-PCL$ خواهد شد که ممکن است فرمولاسیون امیدبخشی برای تحویل انتخابی استاتیک به تومورهای جامد باشد.^{۲۹} در این مطالعه ارزیابی میزان رهش بیان کرد که هیچ‌کدام از فرمولاسیون‌های میسل با پایه‌ی $PEG-b-PCL$ ، قابلیت رهش کنترل‌شده استاتیک را ندارند. لذا احتمال داده می‌شود دارویی با وزن مولکولی پایین مثل استاتیک، به جای هسته بیشتر در پوسته‌ی میسل به دام می‌افتد که منجر به رهش سریع دارو در محیط رهش می‌شود. این اطلاعات نشان می‌دهد که علی‌رغم این که میسل‌های $PEG-b-PBCL$ ، یک حامل قابل قبول برای تهیه نانومایسل‌های داروی استاتیک با مقدار انکپسولاسیون مناسب هستند ولی ممکن است سیستم بارگذاری مناسبی برای تحویل انتخابی دارو به تومور نباشند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، فرمولاسیون‌های میسل برای استاتیک، یک مولکول مهارکننده‌ی STAT3 کم محلول در آب، طراحی شده است. فرمولاسیون‌های ایجاد شده، بر اساس سائز ذرات، نسبت پراکندگی چندانگانه، بارگیری

References

1. Yang CH, Fan M, Slominski AT, Yue J, Pfeffer LM. The role of constitutively activated STAT3 in B16 melanoma cells. *Int J Interferon Cytokine Mediat Res*. 2010 Jan 1;2010(2):1-7. doi: 10.2147/IJICMR.S6657.
2. Fathi N, Rashidi G, Khodadadi A, Shahi S, Sharifi S. STAT3 and apoptosis challenges in cancer. *International journal of biological macromolecules*. 2018 Oct 1;117:993-1001. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.121
3. Jafari S, Lavasanifar A, Hejazi MS, Maleki-Dizaji N, Mesgari M, Molavi O. STAT3 inhibitory statitic enhances immunogenic cell death induced by chemotherapy in cancer cells. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020 Jan 16:1-1. doi: 10.1007/s40199-020-00326-z
4. Wang X, Crowe PJ, Goldstein D, Yang JL. STAT3 inhibition, a novel approach to enhancing targeted therapy in human cancers. *International journal of oncology*. 2012 Oct 1;41(4):1181-91. doi: 10.3892/ijo.2012.1568
5. Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T. Statitic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chemistry & biology*. 2006 Nov 1;13(11):1235-42. doi: 10.1016/j.chembiol.2006.09.018
6. Molavi O, Ma Z, Mahmud A, Alshamsan A, Samuel J, Lai R, et al. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of STAT3 inhibitor cucurbitacins in solid tumors. *International journal of pharmaceutics*. 2008 Jan 22;347(1-2):118-27. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.032
7. Reddy PD, Swarnalatha D. Recent advances in novel drug delivery systems. *Int J PharmTech Res*. 2010;2(3):2025-7. doi: 10.2240/azojono0111
8. Mitra AK, Cholkar K, Mandal A. Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices: William Andrew; 2017. doi : 10.1016/b978-0-323-42978-8.00010-3
9. Aliabadi HM, Mahmud A, Sharifabadi AD, Lavasanifar A. Micelles of methoxy poly (ethylene oxide)-b-poly (ϵ -caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A. *Journal of Controlled Release*. 2005 May 18;104(2):301-11. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.02.015
10. Shin HC, Alani AW, Rao DA, Rockich NC, Kwon GS. Multi-drug loaded polymeric micelles for simultaneous delivery of poorly soluble anticancer drugs. *Journal of Controlled Release*. 2009 Dec 16;140(3):294-300. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.04.024
11. Murthy RS. Polymeric micelles in targeted drug delivery. In *Targeted drug delivery: concepts and design 2015* (pp. 501-541). Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-319-11355-5_16
12. Nishiyama N. Polymeric micelles. In *Cancer Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment 2019* (pp. 177-186). Springer, Tokyo. doi: 10.1007/978-4-431-56880-3_8
13. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release*. 2000 Mar 1;65(1-2):271-84. doi: 10.1016/s0168-3659(99)00248-5
14. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical research*. 2016 Oct;33(10):2373-87. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5
15. Shi Y, Lammers T, Storm G, Hennink WE. Physico-chemical strategies to enhance stability and drug retention of polymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Macromolecular bioscience*. 2017 Jan;17(1):1600160. doi: 10.1002/mabi.201600160
16. Xiong MP, Yáñez JA, Kwon GS, Davies NM, Forrest ML A cremophor-free formulation for tanespimycin (17-AAG) using PEO-b-PDLLA micelles: characterization and pharmacokinetics in rats. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009 Apr 1;98(4):1577-86. doi: 10.1002/jps.21509
17. Ramazani A, Keramati M, Malvandi H, Danafar H, Kheiri Manjili H. Preparation and in vivo evaluation of anti-plasmodial properties of artemisinin-loaded PCL-PEG-PCL nanoparticles. *Pharmaceutical development and technology*. 2018 Oct 21;23(9):911-20. doi: 10.1080/10837450.2017.1372781
18. Aliabadi HM, Brocks DR, Lavasanifar A. Polymeric micelles for the solubilization and delivery of cyclosporine A: pharmacokinetics and biodistribution. *Biomaterials*. 2005 Dec 1;26(35):7251-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.042
19. Shi B, Fang C, You MX, Zhang Y, Fu S, Pei Y. Stealth MePEG-PCL micelles: effects of polymer composition on micelle physicochemical characteristics, in vitro drug release, in vivo pharmacokinetics in rats and

- biodistribution in S 180 tumor bearing mice. Colloid and polymer science. 2005 Jun;283(9):954-67. doi: 10.1007/s00396-004-1243-8
20. Abyaneh HS, Vakili MR, Zhang F, Choi P, Lavasanifar A. Rational design of block copolymer micelles to control burst drug release at a nanoscale dimension. Acta biomaterialia. 2015 Sep 15;24:127-39. doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.017
21. Mahmud A, Xiong XB, Lavasanifar A. Novel self-associating poly (ethylene oxide)-b lock-poly (ϵ -caprolactone) block copolymers with functional side groups on the polyester block for drug delivery. Macromolecules. 2006 Dec 26;39(26):9419-28. doi: 10.1021/ma0613786
22. Sedaghat S, Molavi O, Faridi A, Shayanfar A, Rashidi MR. Development of an HPLC-UV Method for Quantification of Stattic. Current Pharmaceutical Analysis. 2019 Oct 1;15(6):568-73. doi: 10.2174/1573412914666180523092957
23. Coleman IV DR, Ren Z, Mandal PK, Cameron AG, Dyer GA, Muranjan S, et al. Investigation of the binding determinants of phosphopeptides targeted to the SRC homology 2 domain of the signal transducer and activator of transcription 3. Development of a high-affinity peptide inhibitor. Journal of medicinal chemistry. 2005 Oct 20;48(21):6661-70. doi: 10.1021/jm050513m
24. Hannesdóttir L, Tymosuk P, Parajuli N, Wasmer MH, Philipp S, Daschil N, et al. Lapatinib and doxorubicin enhance the S tat1-dependent antitumor immune response. European journal of immunology. 2013 Oct;43(10):2718-29. doi: 10.1002/eji.201242505
25. Theerasilp M, Nasongkla N. Comparative studies of poly (ϵ -caprolactone) and poly (D, L-lactide) as core materials of polymeric micelles. Journal of microencapsulation. 2013 Jun 1;30(4):390-7. doi: 10.3109/02652048.2012.746746
26. Garg SM, Vakili MR, Lavasanifar A. Polymeric micelles based on poly (ethylene oxide) and α -carbon substituted poly (ϵ -caprolactone): An in vitro study on the effect of core forming block on polymeric micellar stability, biocompatibility, and immunogenicity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015 Aug 1;132:161-70. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.015
27. Wang Q, Jiang J, Chen W, Jiang H, Zhang Z, Sun X. Targeted delivery of low-dose dexamethasone using PCL-PEG micelles for effective treatment of rheumatoid arthritis. Journal of Controlled Release. 2016 May 28;230:64-72. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.035
28. Owen SC, Chan DP, Shoichet MS. Polymeric micelle stability. Nano today. 2012 Feb 1;7(1):53-65. doi: 10.1016/j.nantod.2012.01.002
29. Garg SM, Vakili MR, Molavi O, Lavasanifar A. Self-Associating Poly (ethylene oxide)-block-poly (α -carboxyl- ϵ -caprolactone) Drug Conjugates for the Delivery of STAT3 Inhibitor JSI-124: Potential Application in Cancer Immunotherapy. Molecular pharmaceutics. 2017 Aug 7;14(8):2570-84. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b01119