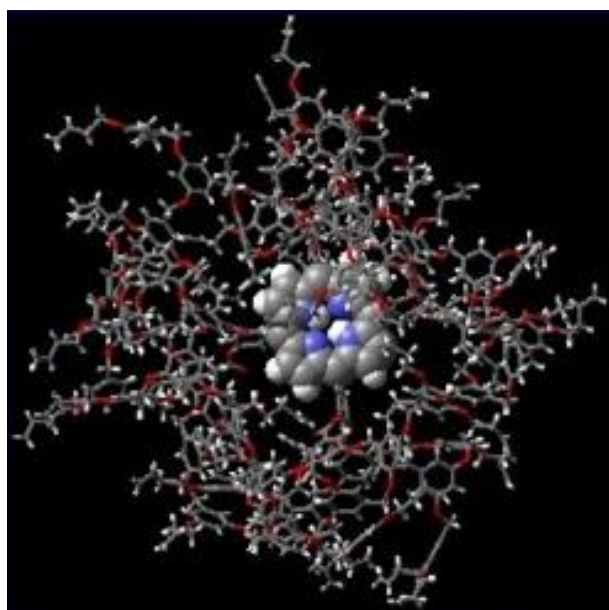




И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин, Р.Ю. Яковлев, Н.Г. Селезнев

**НАПРАВЛЕННЫЙ ТРАНСПОРТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
СРЕДСТВ:
ОТ ИДЕИ ДО ВНЕДРЕНИЯ**

Учебно-методическое пособие



Рязань, 2018

Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова
Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический факультет

И.И. Кулакова, Г.В. Лисичкин, Р.Ю. Яковлев, Н.Г. Селезнев

**НАПРАВЛЕННЫЙ ТРАНСПОРТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ:
ОТ ИДЕИ ДО ВНЕДРЕНИЯ**

Учебно-методическое пособие

Рязань, 2018

**УДК 615.032(075.8)
ББК 52.81**

Рецензенты: **А.Н. Рябков**, д-р мед. наук, доц. кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО;
С.В. Афанасьев, канд. фарм. наук, зам. директора производственного комплекса по качеству ООО «Форт»

Авторы: **И.И. Кулакова**, канд. хим. наук, доц., в.н.с. Химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова;
Г.В. Лисичкин, д-р хим. наук, проф., зав. лаб. химии поверхности МГУ им. М.В. Ломоносова;
Р.Ю. Яковлев, канд. хим. наук, м.н.с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России; н.с. Института геохимии и аналитической химии РАН;
Н.Г. Селезнев, канд. фарм. наук, доц., зав. кафедрой фармацевтической технологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России

Н277 Направленный транспорт лекарственных средств: от идеи до внедрения: учебно-методическое пособие / И.И. Кулакова [и др.]; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. – Рязань: ОТС и ОП, 2018. –104 с.

Учебно-методическое пособие разработано для студентов фармацевтического факультета, составлено в соответствии с учебным планом и рабочей программой по дисциплине «Фармацевтическая технология», содержит информацию об истории, современном состоянии вопроса направленного транспорта лекарственных средств, перспективах, методических подходах к разработке систем доставки. В пособии имеются задания для выполнения практических работ для ряда систем доставки лекарственных средств, контрольные вопросы для собеседования.

Библиогр. 32; рис. 28, табл. 7.

УДК 615.032)075.8)
ББК 52.81

© Авторы, 2018
© ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ	6
ГЛОССАРИЙ ТЕРМИНОВ И ПОНЯТИЙ ИЗ БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ, ХИМИИ И	
ВВЕДЕНИЕ.....	16
Глава 1. ВОЗНИКНОВЕНИЕ ИДЕИ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА	
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	20
1.1. Пауль Эрлих – классик фармакологии, автор идеи направленного транспорта	
лекарственных средств.....	20
1.2. Научные основы направленного действия лекарственных средств –	
сульфаниламидных препаратов	22
1.3. Развитие идеи мишень-агент	24
1.3.1. Концепция агент-мишень	25
1.3.2. Взаимодействие лекарственного средства с мишенью.....	26
Глава 2. РАЗВИТИЕ ИДЕИ СОЗДАНИЯ ИДЕАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВА	28
2.1. Первые лекарственные препараты на основе эмульсий липидов	29
2.2. Открытие липосом.....	30
2.3. Липосомы – первые наноконтейнеры для доставки лекарств	33
2.4. Лекарственные препараты на основе липосом для регионарного введения ..	34
Глава 3. ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СИСТЕМ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ	
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ.....	36
3.1. Активный и пассивный транспорт.....	36
3.2. Использование вектора в системах доставки лекарственных средств.....	37
3.2. Проникновение систем доставки в клетку и высвобождение лекарственного	
средства.....	39
3.4. Разработка липосомальной формы лекарственных средств с адресной	
доставкой	41
3.5. Высвобождение лекарственного средства из системы доставки	47
Глава 4. ПОДБОР НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ	
СРЕДСТВ.....	49
4.1. Носители, их достоинства и недостатки. Подход к подбору носителя.....	49
4.2. Нелипосомальные носители	49
4.2.1. Полимеры – носители в системах доставки.....	49
4.2.2. Циклодекстрины – молекулярные наноконтейнеры	58
4.2.3. Клетки крови – как платформы в системах доставки	62

4.2.4. Углеродные наночастицы	65
4.2.5. Наночастицы металлов и оксидов.....	71
4.3. Системы доставки генов	73
5. СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОГНОЗЫ	76
ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА	82
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА	83
ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ И ОБСУЖДЕНИЯ НА СЕМИНАРАХ	86
ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ	88
Работа 1. Определение критической концентрации мицеллообразования в водных растворах ПАВ	88
Работа 2. Определение размера частиц в золях турбидиметрическим методом.....	93
Работа 3. Получение липосом, нагруженных инсулином	96
Работа 4. Синтез золь наночастиц серебра	101

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНА – детонационный наноалмаз

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

ЛФ – лекарственная форма

МКА – моноклональные антитела

ППН – повышенная проницаемость и накопление

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

УНТ – углеродные нанотрубки

ФК – фосфатидная кислота

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭ – фосфатидилэтаноламин

ЦД – циклодекстрины

ГЛОССАРИЙ ТЕРМИНОВ И ПОНЯТИЙ ИЗ БИОЛОГИИ, МЕДИЦИНЫ, ХИМИИ

Агент – лекарственное средство, которое взаимодействует с клеткой-мишенью там, где локализуется его действие.

Активный направленный транспорт – система доставки лекарственных средств, направленная на специфическое связывание с патологическими тканями или органами.

Ангиогенез – процесс формирования новых кровеносных сосудов из уже существующих.

Антиген – молекула вещества (или форма вещества), способная при попадании внутрь организма, вызвать (индуцировать) образование специфических нейтрализующих антител при иммунном ответе. Такими веществами являются белки, полисахариды, фосфолипиды и их комбинации.

Антитело – молекула особого растворимого белка иммуноглобулина, производимого В-лимфоцитами в ответ на проникновение инородной молекулы в организм белков, образующегося как ответ иммунной системы на наличие в организме антигена. Молекула иммуноглобулина прочно и специфично связывается с инородной молекулой или клеткой, инактивируя ее или маркируя для последующего уничтожения.

Ацидоз (от лат. acidus – кислый) – смещение кислотно-щелочного баланса организма в сторону увеличения кислотности (уменьшению pH).

Везикула (или пузырек) – (в биологии) маленькая мембранная сферическая органелла в цитоплазме эукариотической клетки; (в цитологии) – это относительно маленькие внутриклеточные органоиды, мембрано-защищенные сумки, в которых запасаются или транспортируются питательные вещества; (в химии) – замкнутый *бислой*, представляющий собой углеводородный слой с находящимися на поверхности полярными группами.

Вектор – молекула, обладающая тропностью к определенным соединениям, клеткам или молекулярным структурам и обеспечивающая адресность транспорта лекарственного средства в фармакологическую мишень. Присутствие распознающих молекул на поверхности вектора позволяет ему

сконцентрироваться в заданной области (опухоли, очаге воспаления, около зоны ишемии и т. д.) и доставить туда лекарственное средство.

Воспроизведенный лекарственный препарат – лекарственный препарат, который имеет такой же качественный и количественный состав действующих веществ в такой же форме, что и референтный лекарственный препарат, и биоэквивалентность или терапевтическая эквивалентность которого референтному лекарственному препарату подтверждена соответствующими исследованиями.

Вирус – частица, состоящая из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), заключенной в белковую оболочку и способная размножаться внутри клетки-хозяина и распространяться из клетки в клетку. Часто являются причиной болезней.

Вспомогательные вещества – вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

Гемолиз эритроцитов – разрушение оболочки эритроцитов, сопровождающееся выходом гемоглобина в плазму крови, которая окрашивается при этом в красный цвет и становится прозрачной («лаковая кровь»). Строма разрушенных, лишенных гемоглобина эритроцитов образует так называемые «тени эритроцитов».

Гемолиз эритроцитов осмотический – итог влияния гипотонических растворов натрия хлорида на эритроциты человека.

Гипертермия – перегревание, накопление избыточного тепла в организме человека и животных с повышением температуры тела, вызванное внешними факторами, затрудняющими теплоотдачу во внешнюю среду или увеличивающими поступление тепла извне.

Дженерик (от англ. *generic* – родственный) – термин, принятый для обозначения прямых аналогов лекарственных субстанций, на которые закончился срок патентной защиты. **Дженерики** обеспечивают быстрое

насыщение рынка относительно недорогими отечественными аналогами известных препаратов.

Иммунолипосомы – липосомы, к которым прикреплены моноклональные антитела, обеспечивающие специфическое связывание липосом, содержащих гидрофобный или гидрофильный химиотерапевтический препарат, с соответствующими клетками.

Иммуносомы – см. иммунолипосомы.

Интактные клетки – необработанные (исходные) клетки.

Ионные каналы – порообразующие белки (одиночные либо целые комплексы), поддерживающие разность потенциалов, которая существует между внешней и внутренней сторонами клеточной мембраны всех живых клеток.

Клатрин – консервативный фибриллярный белок (180 кДа), образующий вместе с другими полипептидами характерный многогранный чехол (решеткоподобные структуры) на поверхности так называемых окаймленных пузырьков. Покрытые клатрином пузырьки отвечают за опосредованный рецепторами эндоцитоз.

Клиренс (в фармакологии, токсикологии и медицине) – показатель скорости очищения биологических жидкостей или тканей организма.

Контрастирующий агент – химическое вещество, вводящееся в организм для изменения контраста между двумя тканями.

Конъюгат (лат. *conjugatio* – соединение) – искусственно синтезированная (химически или путем рекомбинации *in vitro*) гибридная молекула, в которой соединены (объединены) молекулы с разными свойствами (например, белковый вектор – химиопрепарат).

Лекарственные препараты – лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности.

Лекарственные средства – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани

организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Лекарственная форма – состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта.

Лизис эритроцитов – разрушение эритроцитов.

Лимфоцит – белая клетка крови, обеспечивающая ответ на появление инородных молекул (антигенов). Лимфоциты либо секретируют антитела (В-клетки), либо регулируют иммунный ответ и участвуют в клеточных реакциях иммунитета (Т-клетки).

Липид – органическая молекула, нерастворимая в воде, но хорошо растворимая в неполярных органических растворителях. Один из классов липидов, фосфолипиды, является структурной основой биологических мембран.

Липидная мицелла – сферические частицы, но в отличие от липосом они образованы только одним слоем липидов. Гидрофильные «головки» всех липидных молекул находятся на наружной поверхности частицы, а гидрофобные «хвосты» обращены внутрь, к центру мицеллы. Поэтому внутренняя среда не водная, а гидрофобная.

Липидный бислой – тонкий бимолекулярный слой, состоящий в основном из молекул фосфолипидов и являющийся структурной основой всех клеточных мембран. Два слоя липидных молекул расположены их гидрофобными концами внутрь, а гидрофильными головами – наружу, к воде.

Липосомы – это сферические пузырьки воды, окруженные одним или несколькими слоями липидов. Внутренняя поверхность липосом, как и

наружная, является полярной. Различают многослойные липосомы, а также крупные и мелкие однослойные липосомы.

Наносомы – липосомы размером в несколько десятков нанометров.

Метод негативного окрашивания – процесс заключения бактерий или других частиц в тонкую пленку разбавленного раствора соли тяжелого металла, которая затем высыхает на стекле.

Микроваскулярная эмболия – закупорка капилляров.

Мишень – это орган, клетка или специфическая молекулярная структура, связывающаяся с лекарством. Эта структура может содержать мембранные белки, распознающие гормоны или рецепторы, а также ионные каналы, нуклеиновые кислоты, молекулы-переносчики или ферменты.

Нанокapsула – носитель, в полость которого помещается лекарственное средство.

Наноконтейнер – носитель наноразмера для создания систем доставки.

Нанолекарство – лекарственный или медицинский диагностический препарат, применяемый в форме наночастиц.

Наноразмерные носители – носители лекарственных веществ, имеющие размер в диапазоне от 1 до 100 нм.

Наносфера – носитель, в котором равномерно распределено лекарственное средство.

Наночастица – носитель наноразмера для создания систем доставки.

Направленный транспорт лекарственных средств – см. **Система адресной доставки лекарственных средств**.

Носитель (или платформа) – служит для закрепления ЛС и способствует его целенаправленной доставке.

Пассивный направленный транспорт – система доставки лекарственных средств, направленная на облегченное преодоление естественных биобарьеров.

Полисахарид – линейный или разветвленный биоразлагаемый полимер, состоящий из остатков сахаров. Примеры полисахаридов – гликоген, гиалуроновая кислота, целлюлоза.

Пролекарство – предшественник активной формы лекарства, который в результате биологических процессов в организме (т.е. метаболизма) превращается в биологически активное вещество.

Пролиферация – разрастание ткани организма путем новообразования клеток.

Пути введения лекарственных средств в организм – обычно подразделяются на энтеральные (через пищеварительный тракт) и парентеральные (минуя желудочно-кишечный тракт).

ПЭГирированные липосомы – это липосомы, содержащие в своем составе фосфолипиды, конъюгированные с полиэтиленгликолем. Имеют пролонгированную циркуляцию в кровотоке.

Репликация ДНК – процесс, с помощью которого создается копия молекулы ДНК.

Ретикулоэндотелиальная система – система клеток, содержащихся в разных системах организма, несущая барьерную и фагоцитарную функции и функцию обмена веществ.

Рецептор (от лат. *Recipere* – получать) – находящаяся на поверхности клетки биологическая макромолекула, которая предназначена для связывания с эндогенными лигандами (нейротрансммиттерами, гормонами, факторами роста). Рецептор может взаимодействовать также с экзогенными биологически активными веществами, в том числе и с лекарственными, и запускать специфический клеточный ответ.

Рецептор-опосредованный эндоцитоз – механизм избирательного поглощения веществ животной клеткой, при котором макромолекула связывается с рецептором клеточной поверхности и попадает внутрь клетки в окаймленных клатрином везикулах.

Сайт рестрикции – специфичная короткая последовательность нуклеотидов, которая распознается рестрикционной нуклеазой. Различные рестрикционные

нуклеазы разрезают ДНК в сайтах с разными последовательностями. Широко применяются в генной инженерии.

Сверхэкспрессия трансферрина (overexpression) – значительное превышение нормы уровня экспрессии трансферрина на поверхности растущих опухолевых клеток.

Система адресной доставки лекарственных средств – способ доставки лекарств в очаг заболевания, позволяющий увеличить концентрацию доставляемого вещества в нужном месте и блокировать его накопление в здоровых органах и тканях. При этом можно повысить продолжительность и эффективность действия, снизить побочные эффекты.

Супрессорные гены – гены, подавляющие мутации в других генах и противодействующие опухолевой трансформации клеток.

Фагоцитоз – захват чужеродных частиц клетками ретикулоэндотелиальной системы.

Фармакодинамика – раздел фармакологии, изучающий локализацию, механизм действия и фармакологические эффекты лекарственных средств, силу и длительность их действия, биохимические, физиологические, побочные и токсические эффекты лекарственных средств.

Фармакокинетика – раздел фармакологии, изучающий кинетические закономерности химических и биологических процессов, происходящих с лекарственным средством в организме млекопитающего: всасывание, распределение, метаболизм (биотрансформацию), связь с белками плазмы и других тканей и элиминацию лекарственных средств.

Фармакофор – это группа атомов в молекуле лекарственного средства, необходимая для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий со специфической биологической мишенью.

Фармацевтическая субстанция – лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность.

Фосфатидилхолины – группа фосфолипидов, содержащих холин. Одни из самых распространенных молекул клеточных мембран.

Фосфатидилэтаноламин – предшественник фосфатидилхолина. Играет жизненно важную роль в функционировании мембран нервных клеток

Фосфатидная кислота – сложный эфир глицерина, в молекуле которого две гидроксильные группы связаны с радикалами высших жирных кислот, а третья – с остатком фосфорной кислоты.

Фосфолипидный бислой – двойной молекулярный слой, формируемый полярными липидами в водной среде.

Фосфолипиды – сложные эфиры многоатомных спиртов и высших жирных кислот, являющиеся основным компонентом липосом.

Форменные элементы крови – общее название клеток крови. К форменным элементам крови относятся эритроциты, лейкоциты и тромбоциты.

Фотодинамическая терапия – метод лечения заболеваний, основанный на применении светочувствительных веществ (фотосенсибилизаторов) и света определённой длины волны.

Цитостатический препарат – противоопухолевое лекарственное средство.

Экзоцитоз – это процесс, при котором внутриклеточные везикулы сливаются с внешней клеточной мембраной.

Экспрессия гена – процесс, в ходе которого ген оказывает влияние на клетку или организм, направляя синтез молекулы белка или РНК с определенной активностью.

Эмболия – закупорка кровеносных сосудов частицами твердых тел, каплями жира или пузырьками газа.

Эндотелиальные клетки – это уплощенные клетки мезенхимного происхождения. Слой клеток, связанных межклеточным «цементом», образует эндотелий, выстилающий стенки кровеносных и лимфатических сосудов и капилляров и обеспечивающий процессы обмена между кровью и тканями, представляет собой непрерывную мембрану.

Эндоцитоз – поглощение клеткой веществ путем «впячивания» наружной мембраны с последующим заключением поглощаемого материала в мембранный пузырек.

Эритроциты (от греч. *erythros* – красный и *kytos* –местилище, здесь – клетка), или красные кровяные клетки, – высокоспецифичные клетки крови животных и человека, содержащие важнейший транспортный белок гемоглобин. Эритроцитам присущи три важнейшие физиологические функции: транспортная, защитная и регуляторная.

Эритроцитарные тени – это мембранные оболочки эритроцитов, получаемые из клеток в гипотоническом солевом растворе.

Эффект повышенной проницаемости и накопления – повышенная проницаемость сосудов в опухоли, способствующая проникновению и накоплению наночастиц в опухоли. Условие для выхода противоопухолевых препаратов из кровеносного русла в пораженные ткани.

Drug delivery – система доставки лекарственных средств.

In vitro – термин, употребляемый при описании процессов, происходящих в изолированных клетках или их клеточных структурах. Клеточными биологами используется для описания клеток, растущих в культуре («в стекле»).

In vivo (от лат. «в жизни») – термин, употребляемый при описании процессов, происходящих в живом организме.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в медицине и фармакологии все большую актуальность приобретает метод *направленного транспорта лекарственных средств*, позволяющий увеличить концентрацию доставляемых средств в определенном месте и блокировать или сильно ограничить их накопление в здоровых органах и тканях. Направленный транспорт позволяет повысить продолжительность и эффективность действия лекарства, снизить побочные эффекты.

Число публикаций по этой тематике, особенно посвященных нанотехнологиям и *нанолекарствам*, неуклонно растет, появляются статьи, монографии и тематические выпуски научных журналов. Переход к новым нанолекарствам открывает большие перспективы для клинической медицины и фармацевтического рынка и сулит производителям высокую прибыль. С 2005 г., согласно Nano Biotech News, в доклиническую, клиническую или коммерческую разработку вошли 130 нанотехнологичных лекарств и систем доставки. Интерес к разработкам систем доставки обусловлен многими причинами и, прежде всего, огромной потенциальной выгодой, как с медицинской, так и с экономической стороны.

Традиционные лекарства имеют ряд недостатков. Так, при введении *лекарственных средств* (ЛС) происходит их неэффективное использование, связанное с распределением лекарства практически по всему организму и, как следствие, невозможностью поддержания терапевтической концентрации в требуемом месте в течение определенного времени. Также из-за отсутствия направленности доставки лекарство не достигает всех биологических *мишеней* или достигает, но в концентрации значительно меньшей по сравнению с терапевтической. Поэтому для достижения необходимой концентрации лекарства в очаге поражения приходится вводить заведомо завышенные дозы

лекарственного препарата. Ненаправленное действие ЛС, т.е. взаимодействие с нецелевыми биообъектами, приводит к побочным эффектам, что особо нежелательно при применении токсичных препаратов.

Разработка *систем доставки ЛС* направлена на повышение терапевтической эффективности, переносимости и безопасности лекарственной терапии. Целями их создания являются: направленность действия, пролонгированное действие, повышение биодоступности ЛС.

Концентрирование лекарственного вещества в пораженном органе снижает токсическое воздействие на организм, уменьшает вводимую дозу и кратность введения, упрощает процедуру применения лекарства. Таким образом, как отмечает Алф Лапрехт в своей монографии, «принцип адресной доставки лекарств – это сокращение общего количества вводимого препарата в сочетании с оптимизацией его активности».

Эти цели достигаются благодаря разработке и внедрению методов направленного транспорта ЛС. Первоначально для обеспечения направленности действия ЛС использовали регионарное введение препаратов, однако этот метод, в общем случае, не является направленным транспортом, так как только в редких случаях очаг поражения легко доступен. Далее исследования были сконцентрированы на разработке и изучении ЛС с модифицированным высвобождением высвобождением. Затем, благодаря открытию наночастиц различной природы, стали изучать возможность создания систем доставки ЛС на основе наночастиц. Несмотря на широкие возможности в выборе носителя возникли определенные проблемы. Оказалось, что препараты, показывающие хорошие результаты в лабораторных условиях, теряют свои функции *in vivo*. Также возникла проблема преодоления биологических защитных барьеров организма. В настоящее время идею направленного транспорта лекарств реализуют, выбирая *носитель*, связывая его с переносимым ЛС и обеспечивая доставку к патологическому очагу.

В адресной доставке лекарств используются наночастицы – носители, размер которых не должен быть более одного микрона (тысячи нанометров). Системы доставки создаются путем помещения ЛС либо в *нанокapsулу*, в которой лекарство находится в полости, окруженной проницаемой мембраной, либо в *наносфере*, в которой лекарство диспергировано по всему объему. Существенным преимуществом таких систем доставки является защита активных лекарственных средств от распада и метаболизма. Также системы доставки получают путем связывания ЛС с поверхностью носителя–наночастицы, в этом случае оно не защищено от распада в организме под воздействием среды. При этом могут быть созданы сложные *конъюгаты*, состоящие из носителя, к которому присоединены молекулы *фармацевтической субстанции*, *вектор*, отвечающий за направленный транспорт, иногда фрагмент, обеспечивающий возможность отслеживания конъюгата, а также молекулы ПАВ на поверхности наночастиц, снижающие узнаваемость наночастиц макрофагами.

В качестве носителей ЛС выступают *липосомы*, полимерные наночастицы, углеродные наночастицы, клетки крови, наночастицы металлов, оксидов и др. Наночастицы в качестве носителей должны иметь малый размер и обеспечивать повышенную биодоступность фармацевтических субстанций. Широкий выбор носителей позволяет создавать системы доставки с варьированием скорости и места высвобождения ЛС.

Таким образом, создание систем доставки ЛС является актуальной научной и практически значимой задачей. В настоящем учебном пособии прослежены основные этапы становления области фармакологии и фармации «направленный транспорт лекарственных средств», рассмотрено современное состояние научных и практических достижений в этой области и сделана попытка прогнозирования тенденций дальнейшего развития этого направления.

Изучение материалов, а также выполнение практических работ, представленных в разработанных авторами учебно-методического пособия «Направленный транспорт лекарственных средств: от идеи до внедрения» будет способствовать систематизированию и расширению знаний по дисциплинам «Фармацевтическая технология», «Биотехнология», формированию следующих общепрофессиональных (ОПК) и профессиональных (ПК) компетенций: ОПК-9, ПК-3, ПК-20, ПК-21.

Целью изучения указанного учебно-методического пособия является углубление теоретических знаний, формирование умений в решении поставленных задач, представленных в учебно-методическом пособии, а также в формировании вышеуказанных компетенций в соответствии требований образовательного стандарта 33.05.01 по специальности Фармация.

Глава 1. ВОЗНИКНОВЕНИЕ ИДЕИ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1.1. Пауль Эрлих – классик фармакологии, автор идеи направленного транспорта лекарственных средств

Идея направленного транспорта лекарственных средств – «волшебной пули» – принадлежит выдающемуся немецкому учёному Паулю Эрлиху, который выдвинул её в 1906 г. «Волшебная пуля», по его мнению, представляет собой идеальное лекарство, «которое способно самостоятельно найти источник болезни или очаг заболевания и поразить их, не затрагивая здоровые органы и ткани организма».



Пауль Эрлих (1854-1915) – выдвинул идею создания систем доставки лекарственных средств

Пауль Эрлих (1854-1915) является крупнейшим ученым конца XIX – начала XX веков. С его именем связаны важнейшие достижения в области медицины, биологии и химии. Он был одним из первых лауреатов Нобелевской премии в области физиологии и медицины.

Родился П. Эрлих в 1854 г. в еврейской семье на востоке Германии, в Силезии, в маленьком городке Штрелен. Большое влияние на Эрлиха оказал его двоюродный брат Карл Вейгерт (1845–1904), микробиолог, один из пионеров применения синтетических анилиновых красителей для избирательного окрашивания определенных элементов живых тканей и приготовления биологических препаратов для микроскопических исследований. Тогда же сложился и стиль мышления Пауля – конкретный, естественнонаучный,

химико-биологический. Окончив гимназию, он поступил на медицинский факультет Страсбургского университета, где преподаватели хотели приобщить его к медицине в том виде, как они сами ее понимали. Эрлиха же тянуло в сторону химии и микробиологии, его воодушевляли идеи Луи Пастера и Роберта Коха. Диплом врача он получил в Лейпциге в 1878 г. После этого П. Эрлих начал работать врачом в известной берлинской университетской клинике Шарите, и вскоре стал заведующим отделением. Свою докторскую степень по медицине он получил, защитив диссертацию по теории и практике окрашивания тканей животных. Его дальнейшие исследования красителей заложили основы работ по гематологии и окрашиванию тканей. В 1890 г. он начал свои, ставшие классическими, иммунологические исследования, за которые получил Нобелевскую премию (1908 г., совместно с русским ученым И.И. Мечниковым). Также П. Эрлих считается основоположником научной химиотерапии: именно он «привел химию в медицину». Постоянная работа с красителями, с химическими соединениями привела его к представлению о том, что иммунитет обусловлен действием химических соединений. Свою работу он основывал на идее, что химическая структура используемых лекарств должна изучаться применительно к их способу действия и их сродству к тем клеткам организма, против которых они направлены. Целью П. Эрлиха было подобрать идеальное лечебное средство с минимальным воздействием на ткани всего организма и максимальным на родственные структуры рецепторов бактерий и паразитов.

В 1904 г. П. Эрлих опубликовал три статьи в Бостонском медицинском и хирургическом журнале, предшественнике «Журнала медицины Новой Англии». Эти статьи касались исследований ученого в области иммунологии. В них описаны иммунохимия, механизм иммунного гемолиза *in vitro* и теория боковых цепей, обосновавшая механизм образования антител к чужеродным веществам.

На протяжении многих лет П. Эрлих изучал воздействие на бактерии, трипаносомы, простейшие и другие организмы различных химических веществ – мышьяковистых, нитробензольных и некоторых других соединений. В 1910 г. он объявил научному миру о создании синтетического препарата, который освобождает организм от спирохеты, возбудителя сифилиса. “Препарат 606” получил впоследствии название сальварсан – “спасающий мышьяк”. Это была успешная 606-ая попытка создать лекарство. Сальварсан принес П. Эрлиху мировую славу. Еще через три года был создан “препарат 914” – неосальварсан, более эффективный и безопасный, он преимущественно и использовался в дальнейшем.

Идея «волшебной пули» не сразу получила свое развитие. Это объясняется трагическими событиями первой половины XX в., такими как мировые войны и революции, а также эмпирическим характером развития химии и практическим отсутствием аппаратных методов исследования. Не было известно, как устроены мишени, как работают лекарства. Всё это выяснялось в дальнейшем по мере развития химии, физики, биологии, медицины и техники. Последующее развитие науки и появление новых методов исследования через десятки лет привели к возрождению идеи П. Эрлиха.

1.2. Научные основы направленного действия лекарственных средств – сульфаниламидных препаратов

Благодаря тому, что П. Эрлих сформулировал принципы лечения инфекционных заболеваний с помощью химических веществ, медицина перешла в новую эпоху химиотерапии, которая получила ускоренное развитие с открытием сульфаниламидных препаратов.

Сульфаниламиды – лекарственные средства, используемые для лечения инфекционных заболеваний, в основном бактериального происхождения. Их открытие, описанное ниже, подтверждает предсказание П. Эрлиха о

возможности создания лекарственных систем для избирательного поражения бактерий.



Генрих Домагк (1895 - 1964) – первооткрыватель сульфаниламидных препаратов

Открытие этого класса лекарственных соединений произошло при исследовании азокрасителей – синтетических красителей, в структуру которых входит сульфаниламид $\text{H}_2\text{N}-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{SO}_2\text{NH}_2$. В 1932 г. химики немецкого концерна «I.G. Farbenindustrie» получили пронтозил (красный стрептоцид), а в 1934 г. немецкий ученый-фармаколог Г. Домагк, руководивший исследовательским отделом корпорации, открыл его противобактериальные свойства. Он выяснил, что этот азокраситель эффективен против стрептококковых инфекций у мышей. За открытие антибактериального эффекта пронтозила ему в 1939 г. была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Однако по указу Гитлера гражданам Германии было запрещено принимать нобелевские награды. Медаль и диплом Г. Домагк получил только в 1947 г. Позже французский химик Э. Фурно обнаружил, что антибактериальным действием обладает именно сульфаниламидная часть молекулы пронтозила, а не структура, придающая ему окраску.

Действие лекарства основано на подавлении роста и размножения микроорганизмов. Оно связано с тем, что сульфаниламид нарушает образование необходимых для их развития ростовых факторов, в частности фолиевой кислоты, в молекулу которой входит *para*-аминобензойная кислота. Сульфаниламид является конкурентным антагонистом для *para*-аминобензойной кислоты, которая участвует в синтезе фолиевой кислоты. При его наличии фермент, осуществляющий биосинтез фолиевой кислоты, вместо *n*-аминобензойной кислоты использует ее имитатор-антагонист

(сульфамидный фрагмент). В результате микроорганизм вместо фолиевой кислоты (1) синтезирует псевдофолиевую кислоту (2) (рис.1).

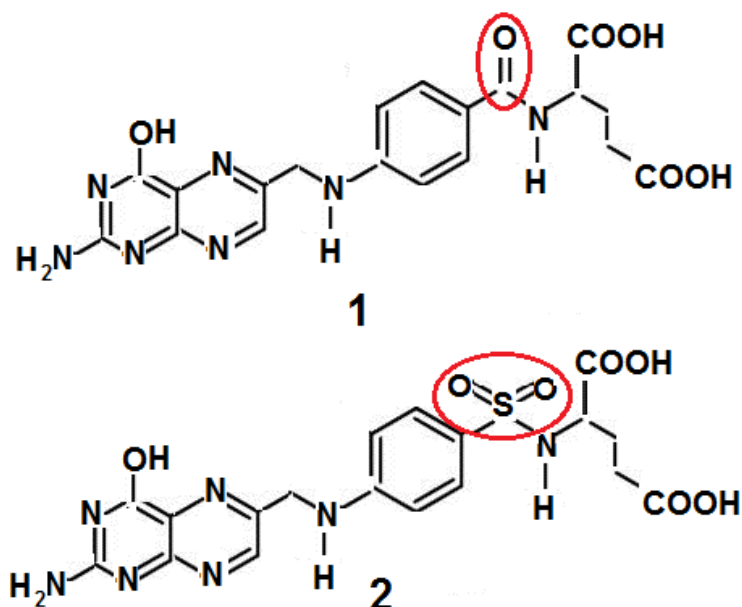
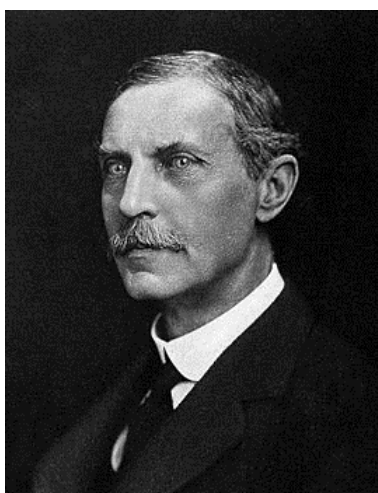


Рис. 1. Структуры фолиевой кислоты (1) и псевдофолиевой кислоты (2)

Эти изменения в структуре фолиевой кислоты блокируют образование нормальных метаболитов. В результате в клетке микроорганизма угнетается синтез нуклеиновых кислот и достигается бактериостатический эффект.

1.3. Развитие идеи мишень-агент



Джон Лэнгли (1852-1925) – английский физиолог и гистолог, член Лондонского королевского общества

Постулат о том, что лекарственное вещество (*агент*) для осуществления своего эффекта должно сначала связаться с соответствующими *рецепторами* в клетках патологического очага (*мишени*) был сформулирован Джоном Лэнгли.

Темой его работ было влияние ядов и лекарств на функции нервной системы. В 1878 г. он изучал, как влияют алкалоиды пилокарпин и атропин на слюноотделение; позже в 1905 г. исследовал действие никотина и кураре на скелетные мышцы. Дж. Лэнгли предположил, что клеточные *рецепторы*

— белки, под действием различных веществ меняют своё состояние и за счет этого управляют работой клетки. Этот постулат получил дальнейшее развитие в работах Пауля Эрлиха.

1.3.1. Концепция агент-мишень

Концепция *агент-мишень* основана на том, что лекарственное средство для реализации своего эффекта должно сначала связаться с соответствующими рецепторами, находящимися на клетках мишени.

Избирательность действия ЛС определяется его *фармакодинамикой* и *фармакокинетикой*, метаболизмом и выведением из организма. Как утверждает К. Пейдж, лекарственные средства действуют на четырех разных уровнях:

- молекулярный уровень, на котором белковые молекулы являются непосредственными мишенями для большинства лекарств;
- клеточный уровень, на котором биохимические и другие компоненты клетки участвуют в процессах трансдукции (создании биологического ответа на определенное внешнее воздействие);
- тканевый уровень, на котором происходит изменение функций сердца, кожи, легких и др.;
- системный уровень, на котором происходит изменение функций сердечно-сосудистой и нервной систем, желудочно-кишечного тракта и др.

Агентом может выступать ЛС, связывающееся с мишенью с помощью *фармакофора*.

Мишень – это специфическая молекулярная структура, связывающаяся с лекарством. В качестве молекулярных мишеней выступают рецепторы гормонов и нейротрансмиттеров, ферменты, ионные каналы, молекулы-переносчики, нуклеиновые кислоты. *Рецептор* – та часть мишени, которая связывается с лекарством.

Взаимодействие с рецепторами осуществляется за счет межмолекулярных связей. Рецепторами чаще всего являются белки. Активные центры рецепторов это функциональные группы аминокислот, фосфатиды,

нуклеотиды и др. По кинетическим характеристикам выделяют G-белок-связанные рецепторы, ДНК-связанные рецепторы, рецепторы-ферменты (тирозинкиназные рецепторы), рецептор-связанные каналы.

При взаимодействии с рецепторами-ферментами лекарства могут угнетать или повышать активность этих ферментов, а также являться для них “ложными” субстратами.

Другой молекулярной мишенью являются *ионные каналы*. Лекарства, связывающиеся с ними, должны имитировать или блокировать действие естественных лигандов ионных каналов.

Транспортные белки связываются с сахарами, нуклеиновыми кислотами, аминокислотами и переносят их через клеточную мембрану. При связывании происходит изменение конформации транспортного белка, что обеспечивает перенос через мембрану в клетку.

Использование в качестве мишени нуклеиновых кислот позволяет оказать прямое воздействие лекарственного средства на определенные гены, например, повреждение ДНК и препятствие ее восстановлению.

Следует также учитывать, что лекарство может не достигнуть молекулярной мишени, например, клеток мозга, из-за гематоэнцефалического барьера.

1.3.2. Взаимодействие лекарственного средства с мишенью

Наиболее известным типом взаимодействия агент – мишень является взаимодействие *антител* – иммуноглобулинов, вырабатываемых клетками иммунной системы с *антигенами*, молекулами чужеродных веществ, способных специфически связываться с антителами.

Другой тип – сигнальные механизмы взаимодействия между клетками. Так, сигнальные молекулы действуют на клеточную мишень, при связывании их с белками-рецепторами. При этом белки-рецепторы активируются. Примеры сигнальных механизмов следующие:

- влияние на транскрипцию ДНК (стероидные и тиреоидные гормоны);
- прямое влияние на активность эффекторного фермента (инсулиновые рецепторы);
- прямое влияние на ионные каналы (Н-холинорецепторы, ГАМК-рецепторы);
- опосредованное влияние через G-белки (М-холинорецепторы, адренорецепторы).

Глава 2. РАЗВИТИЕ ИДЕИ СОЗДАНИЯ ИДЕАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВА

Рассмотрим процесс распространения лекарственного вещества в организме ещё раз. После инъекции или перорального введения «обычного» лекарства оно попадает в кровоток, который более или менее равномерно распределяет молекулы лекарства по всем органам и тканям организма (рис. 2а).

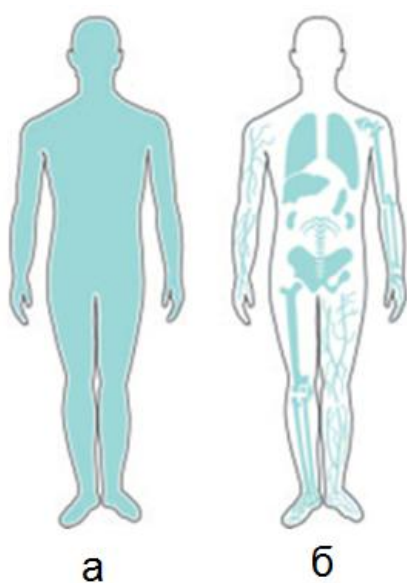


Рис. 2. Различия в распределении лекарственных средств: **а** – при традиционном способе применения; **б** – с использованием направленных систем доставки, изменяющих биораспределение препаратов и обеспечивающих доставку лекарственных средств в органы-мишени, тем самым, уменьшая токсические побочные эффекты

Небольшая часть лекарства – по разным данным всего от 0,001 до 0,01% – попадает в очаг поражения, основная же его часть в лучшем случае расходуется бесполезно, в худшем – вызывает токсический эффект. Адресная доставка предполагает иную схему: носитель с лекарством попадает в кровоток, циркулирует в организме и накапливается только в очаге поражения. Для реализации этой слегка идеализированной схемы необходимо решить несколько весьма непростых задач.

1. Необходимо сформулировать требования к носителю лекарственного средства: биосовместимость, нетоксичность, достаточная ёмкость, защищённость от действия ретикулоэндотелиальной системы, лёгкость наполнения лекарственным веществом, но вместе с тем прочность удерживания ЛС в процессе доставки.

2. Носитель необходимо снабдить «устройством», которое обеспечит его доставку по нужному адресу. Это может быть либо химическое вещество, селективно взаимодействующее с очагом поражения, либо вещество, позволяющее управлять носителем с помощью физических полей, например магнитных.
3. Доставленный «по адресу» нагруженный носитель необходимо управляемо разгрузить, т.е. он должен высвободить ЛС либо под действием внешнего фактора (изменение температуры, кислотности среды, воздействие ультразвука, света и т.д.), либо за счёт диффузии или конвекции.
4. Освободившиеся от ЛС контейнеры не должны накапливаться в организме.

Более подробно о типах носителей будет сказано далее.

2.1. Первые лекарственные препараты на основе эмульсий липидов

В декабре 1932 г. Д. Джонсон зарегистрировал британский патент от имени «I.G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft», в котором указано, что «фармацевтические препараты для инъекций в мышечную систему или подкожно, могут быть получены путем комбинирования лекарственных средств с жидкостями, такими как жиры или масла, при необходимости вместе с восками или воскоподобными веществами, с водой или другими жидкостями, и диспергирующим агентом. Получена система, способная удерживать любую желаемую дозу лекарственного средства, высвобождая его в течение любого желательного промежутка времени постепенно ... без малейшего ущерба для организма». Но что представляла собой эта «эмульсия», почему она удерживала лекарство, авторы патента не знали, да и предположить не могли. Ответ на этот вопрос, был получен только через 30 лет.

Но, тем не менее, эти фармацевтические препараты мы вправе считать прототипом системы доставки, так как их отличает выполнение некоторых важных требований, предъявляемых к идеальным системам доставки ЛС, а именно то, что система способна удерживать любую желаемую дозу

лекарственного средства и высвободить его в течение любого желательного промежутка времени постепенно без малейшего ущерба для организма.

2.2. Открытие липосом

В 1950-х гг. А.Д. Бэнгхем и Р.М.К. Доусон, исследуя взаимодействие фосфолипаз с дисперсиями лецитина, получили мутные жидкости и назвали образующие их тела «эмульсионными частицами» и «мицеллами». Авторы проводили исследования, измеряя только электрофоретическую активность полученных дисперсий, поскольку в то время они не имели других методов исследования.



Алек Дуглас Бэнгхем (1921–2010) – английский биофизик, известен исследованиям липосом и изобретением клинически полезных искусственных сурфактантов лёгких (смесь поверхностно-активных веществ, выстилающая лёгочные альвеолы изнутри)

Дисперсии образовывали большие и малые «сферолиты», независимо от того, были ли они получены путем ручного встряхивания или с помощью ультразвука, причем в последнем случае в образце было больше мелких сферолитов. Сферолиты имели слоистую структуру с липидным слоем толщиной 4,4 нм и полостью размером 2,6 нм, заполненной водой. Целью этой работы было установить, может ли *метод негативного окрашивания* визуализировать такой бимолекулярный *липидный бислой*, который мог бы наблюдаться *in vivo*, а также возможно ли модифицирование такой структуры.

Примеры полученных А.Д. Бэнгхемом и Р.В. Хорном электронных микрофотографий приведены на рис. 3.

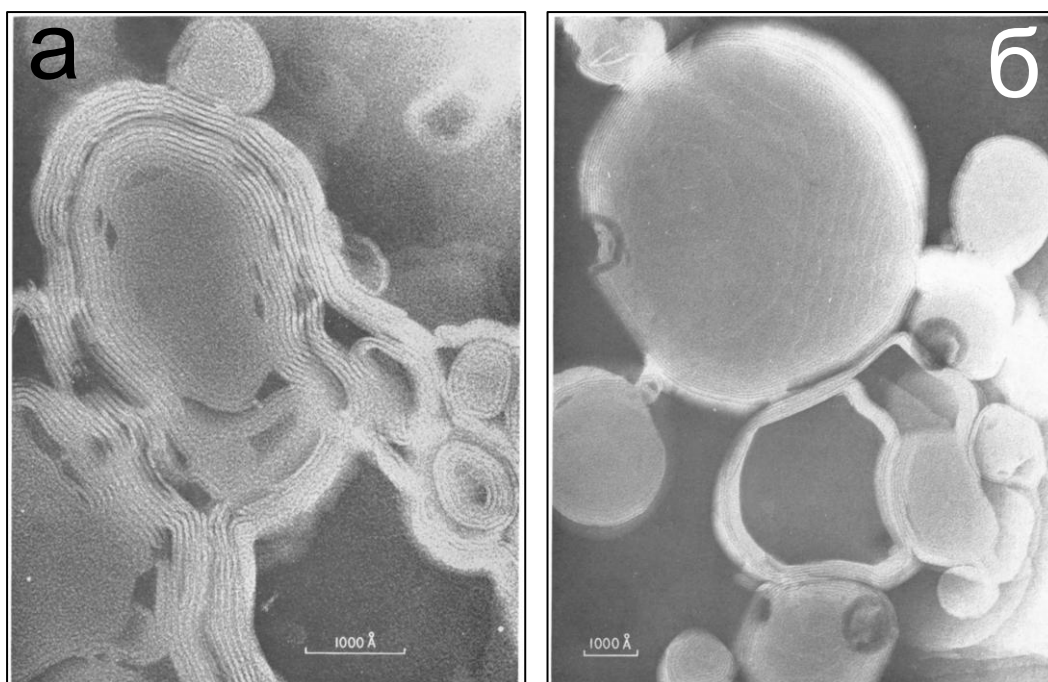


Рис. 3. Электронные микрофотографии: лецитина (а); смеси лецитина и холестерина (б)

Выше упоминалось, что в 1950-х гг. А.Д. Бэнгхем и Р.М.К. Доусон исследовали взаимодействие фосфолипаз с дисперсиями лецитина в буфере, но видеть то, чем образованы эти их дисперсии, они не могли. Вот, что пишет А.Д. Бэнгхем в своих воспоминаниях об этом исследовании: «В ноябре 1961 г., вскоре после приобретения Институтом физиологии животных в Бабрахаме первого электронного микроскопа, Р.В. Хорн и я попытались визуализировать дисперсию *фосфолипидов* в водном негативно окрашенном пятне. К концу 1962 г. мы убедились, что видим небольшие мешочки диаметром около 50 нм, первые «липидные сомы» – *липосомы* (от греч. *липос*– жир и *сома*– тельце или частица), как мы их назвали. Мы утверждали, что наша модель может быть сформирована из фосфолипидов с добавлением или без добавления холестерина, длинноцепочечных катионов или анионов и при этом не было необходимости в растворителях. После того как мы изучили осмотические свойства липосом, наша работа в 1965 г. была представлена на международном совещании по мембранам во Фраскати (Италия) и стала очень популярной».

В 1972 г. А.Д. Бэнгхем опубликовал некоторые из ранних работ по системам упорядоченных фаз с участием *липидов* и воды, в том числе и британский патент Дж. Джонсона (фармацевта в «I.G.Farbenindustrie») от 1932 г. на эмульсионные фармацевтические препараты для инъекций в мышечную систему или подкожно. В патенте было описано и приготовление эмульсии: «Эмульсию готовят из: 25 частей лецитина; 20 частей воды; 1,5 части холестерина; 0,03 частей строфантина». Конечно, представляется маловероятным, что фармацевты «I.G. Farbenindustrie» в 1930-е годы понимали, что их непрозрачная «эмульсия» состояла в действительности из замкнутых бимолекулярных мембран, каждую из которых разделяла водная среда, содержащая растворённый строфантин, так как они не могли изучить эти структуры из-за отсутствия соответствующих методов исследования.

Молекулы липидов способны образовывать в водной среде два различных типа структур – липосомы и мицеллы. Обычно термины «липосомы» и «липидные везикулы» используют как синонимы. Однако впервые липосомами были названы частицы, образующиеся при механическом диспергировании взвеси набухших фосфолипидов в воде.

Липосомы представляют собой замкнутые пузырьки, образованные одним или несколькими бислоями липидов, внутри которых заключено пространство, обычно заполненное водой с растворёнными в ней веществами (рис. 4).

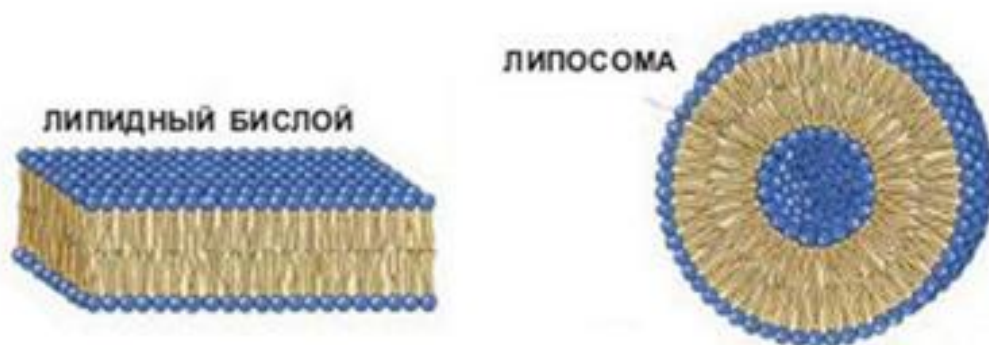


Рис. 4. Липидный бислой и замыкание его в липосому

Липосомы классифицируют на несколько видов по их размеру и характеру ламеллярности (рис. 5).

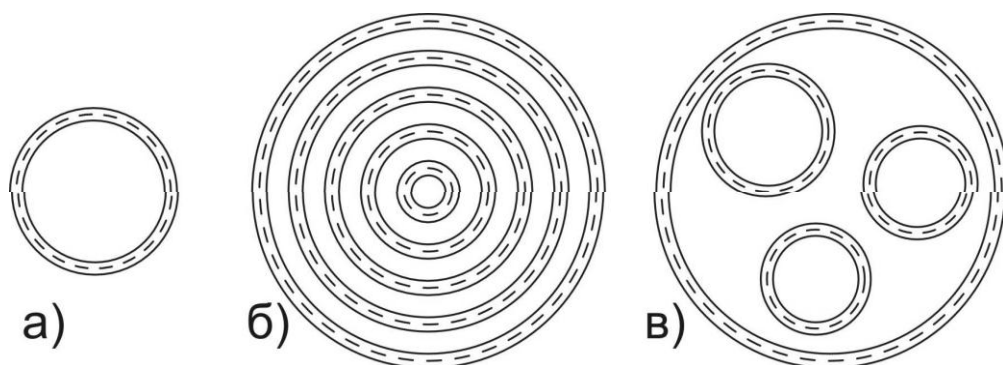


Рис. 5. Схематическое изображение различных видов липосом: моноламеллярные (а), мультиламеллярные (б) и олиговезикулярные (в)

Различают малые моноламеллярные липосомы (диаметром 10 – 100 нм), большие моноламеллярные липосомы (диаметром 100 – 1000 нм) и гигантские моноламеллярные липосомы (диаметром более 1 мкм). Помимо этого выделяют мультиламеллярные липосомы, образованные множеством концентрически расположенных сферических бислоев, и олиговезикулярные липосомы, в которых малые липосомы располагаются внутри большой липосомы.

2.3. Липосомы – первые наноконтейнеры для доставки лекарств

В 1976 г. английский исследователь Грегори Грегориадис предложил помещать внутри липосом лекарственные вещества, чтобы способствовать их проникновению в организм. Это может считаться началом использования *наноконтейнеров*. Г. Грегориадис был автором статей и патентов по созданию «липосомных препаратов» (термин автора).

Исследование липосом Г. Грегориадис начал в 1970-х гг. Он изучил распределение липосом в организме, воздействие противораковых и противомикробных липосомных препаратов *in vivo*, впервые продемонстрировал нацеливание липосом на опухолевые клетки *in vitro* (с помощью привитых антител). Его научные обзоры, опубликованные в 1976 г., привлекли внимание к системам доставки на основе липосом. Г. Григориадис основал биотехнологическую компанию «Xenetic Biosciences Inc.». Он



Грегори Григориадис (р.1934) – биохимик, президент международного общества липосом, основатель биотехнологической компании «Xenetic Biosciences Inc »

обладатель патента на методику получения липосомных препаратов. Его фирма выпускает такие препараты, как «PolyXen», представляющий собой систему доставки белков, «ImuXen», который можно использовать как систему доставки липосомных вакцин, и «VesicALL» – систему доставки *цитостатических препаратов*.

Для получения липосом используют различные способы. Дегидратация, при которой липид растворяют в органическом растворителе, причем наиболее универсальным растворителем является хлороформ. После этого при высушивании раствора образуется пленка липида.

Затем к этой пленке добавляют воду и получают многослойные липосомы. Если обработать липидную суспензию ультразвуком, то можно получить однослойные липосомы. Также липосомы получают методом испарения в обращённой фазе, путем растворения в детергенте, методом экструзии и др.

От выбранного способа получения зависят характеристики и размер липосом. Чаще всего используют мелкие липосомы, так как они дольше выводятся *ретикулоэндотелиальной системой (РЭС)*. При увеличении размера липосом возрастает их захват РЭС.

2.4. Лекарственные препараты на основе липосом для регионарного введения

Первоначально идея направленного транспорта была реализована путём создания препаратов для регионарного (местного) введения (табл.1). Коллоидные системы на основе липидов были разработаны и испытаны как для местного нанесения на кожу или слизистую, так и для *парентерального введения*.

Таблица 1

Липосомальные препараты для регионарного введения

№	Тип применения	Липосомальные препараты
1	Наружное	Липосомы с триамцинолоном включены в гель. Обнаружена более высокая концентрация препарата в коже и более низкая концентрация в крови, чем в случае контрольного препарата.
2	Офтальмологическое	Использование липосом повышало концентрацию пенициллина в роговице кролика.
3	Пероральное	Липосомы, содержащие гепарин, увеличивали время его действия.
4	Парентеральное	Липосомы, содержащие метотрексат, были использованы для доставки лекарственного средства в опухоли. Опухоль была предварительно нагрета до 42 °С, что способствовало высвобождению лекарственного средства в опухоли.

Анализ приведенных в таблице результатов свидетельствует, что использование липосом с инкапсулированными в них лекарственными средствами и приводило к увеличению их концентрации в патологическом очаге, увеличению времени действия препарата и способствовало высвобождению ЛС в определенном месте. В случае местного введения липосомальных препаратов не требуется специфического транспорта липосом; они действуют, медленно высвобождая ЛС в окружающую среду.

В 1987 г. на рынок были выведены новые косметические продукты на основе липосом: в частности, гель «Каптюр» фирмы «Кристиан Диор» и крем для кожи под названием «Ниосомы» фирмы «Л'Ореаль».

Рассмотренные лекарственные препараты с некоторой условностью можно отнести к «*drug delivery*» первого поколения, которые более подробно будут рассмотрены в главе 3 (раздел 3.5).

Глава 3. ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ СИСТЕМ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

3.1. Активный и пассивный транспорт

По одной из классификаций адресную доставку можно подразделить на *пассивный направленный транспорт* и *активный направленный транспорт* (рис. 6).

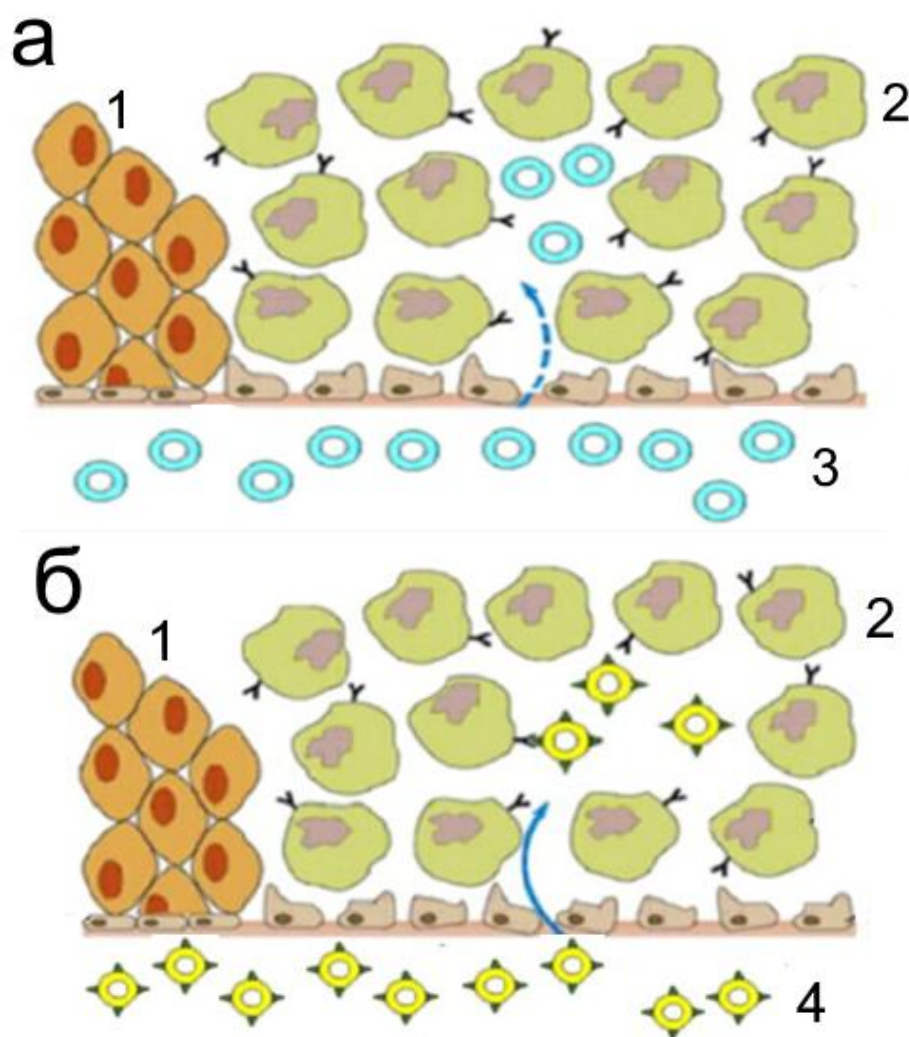


Рис. 6. Схематичное представление пассивного (а) и активного (б) направленного транспорта. 1 – нормальные клетки; 2 – опухолевые клетки; 3 – липосомы для пассивного транспорта; 4 – липосомы для активного транспорта

Пассивный направленный транспорт, например, основан на эффекте *повышенной проницаемости и накопления* (ППН) и зависит от микроокружения опухолей. Пассивный направленный транспорт основан на способности ЛС самопроизвольно накапливаться в нужных органах или тканях. Это вполне возможно, так как в пораженных очагах часто наблюдаются *ацидоз* и *гипертермия*. Активный направленный транспорт осуществляется за счет связывания с ткане-/клеточно-специфическими маркерами, ведущего к локализованному накоплению наноносителей.

3.2. Использование вектора в системах доставки лекарственных средств

Впервые эксперимент с использованием вектора был выполнен в 1958 г. Для нацеливания ЛС (метотрексата) оно был конъюгировано (связано) с антителом. Однако термина «вектор» в то время еще не существовало, он появился только в 1970-х гг. В 1975 г. иммунологи С. Мильштейн и Г. Кёллер разработали метод создания гибридных соматических клеток для получения антител. Это открыло возможность широкого применения антител.



Сезар Мильштейн (1927 – 2002)

Георг Келлер (1946 – 1995)

награждены Нобелевской премией за теорию, объясняющую специфичность развития и регуляции иммунной системы и открытие принципа производства моноклональных антител

Вектор – это соединение, обеспечивающее адресность доставки лекарственного средства в фармакологическую *мишень*. После присоединения вектора к конъюгату «наночеситель – ЛС» полученная структура должна быть стабильной и нетоксичной, должны сохраняться способность распознавания мишени и эффективность загрузки наночесителя ЛС.

В качестве векторов могут выступать специфические белки (трансферин, пептидный гормон гаподолиберин), радиомеченные моноклональные антитела, вирусы, фолиевая кислота. *Вектор* (в *генетике*) – генетический элемент, обычно бактериофаг или плазида, используемый для переноса фрагмента дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в клетку реципиента с целью клонирования гена.

Первыми векторами, использованными для направленной доставки, были *антитела*, связанные с липосомами. Метод их присоединения был относительно прост и позволял прививать достаточное количество антител к поверхности липосом без нарушения целостности липосом или изменения средства и специфичности антител. Конъюгация ЛС с белковым вектором может быть осуществлена с помощью химической сшивки (образование дисульфидной или тиоэфирной связи), полиэтиленгликолевого или полипептидного линкера (рис. 7). При этом способ конъюгации должен

обеспечивать высокий выход реакции и возможность внутриклеточного расщепления конъюгата.

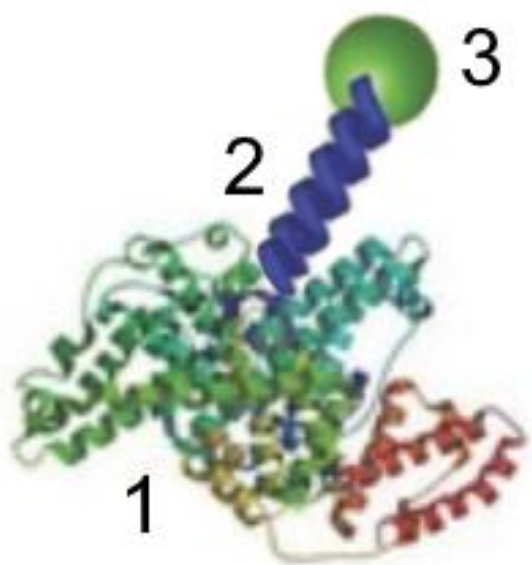


Рис. 7. Схема строения конъюгата.

1 – белковый вектор (носитель);
2 – линкер; 3 – лекарственное средство

В дальнейшем специфические антитела были использованы и в случае нелипосомных носителей. Так, наночастицы, изготовленные из желатина и сывороточного альбумина, были модифицированы герцептином – антителами, рецептор-специфичными к терапевтической мишени, а именно к белку HER-2. Также различные антитела связывали с поверхностью наночастиц дендримеров – синтетических сверхразветвлённых полимеров, имеющих структуру каскадно-разветвлённой цепи. Такие модифицированные частицы дендримера приобретали способность специфически связываться с опухолевыми клетками, содержащими соответствующие рецепторы.

Векторными свойствами обладает также трансферин. Из-за того, что трансферрин *сверхэкспрессируется* на поверхности многих опухолевых клеток, он является популярным *вектором* для разных носителей ЛС в опухоли. Дополнительное связывание трансферрина с *ПЭГилированными липосомами* (см. раздел 3.4.) обеспечивает направленность ЛС в опухоли. Так, конъюгат трансферрина с *иммунолипосомой* был использован для направленной доставки лекарства в головной мозг.

Широко используется в качестве вектора фолиевая кислота. Так, конъюгат доксорубицина с липосомами доставлялся в различные опухолевые клетки благодаря фолиевой кислоте. Фолиевую кислоту и затем препарат паклитаксел присоединяли к наночастицам на основе ПЭГ-поликапролактона. Этот конъюгат показал высокую цитотоксичность. Фолиевой кислотой были модифицированы магнитные наночастицы. Они лучше усваивались раковыми клетками, чем обычные наночастицы.

3.2. Проникновение систем доставки в клетку и высвобождение лекарственного средства

Отдельного внимания заслуживает высвобождение молекул ЛС и его проникновение в клетку при попадании системы доставки в патологический очаг. Этот процесс в значительной степени зависит от характера

взаимодействия носителя (например липосом) с мембраной клетки. Характер взаимодействия липосом с мембраной клетки может быть разным (рис. 8):

- мембраны липосомы могут слиться с мембранами клеток и стать их частью, при этом могут измениться свойства клеточных мембран, в том числе увеличиться проницаемость мембраны клетки за счет образования дополнительных мембранных каналов;
- липосома поглощается клеткой путем *эндоцитоза*, в этом случае ЛВ, которое она доставила, попадает непосредственно в клетку;
- липосома может прикрепиться к мембране, т.е. адсорбироваться на ней;
- иногда клеточная мембрана и липосома обмениваются липидами.

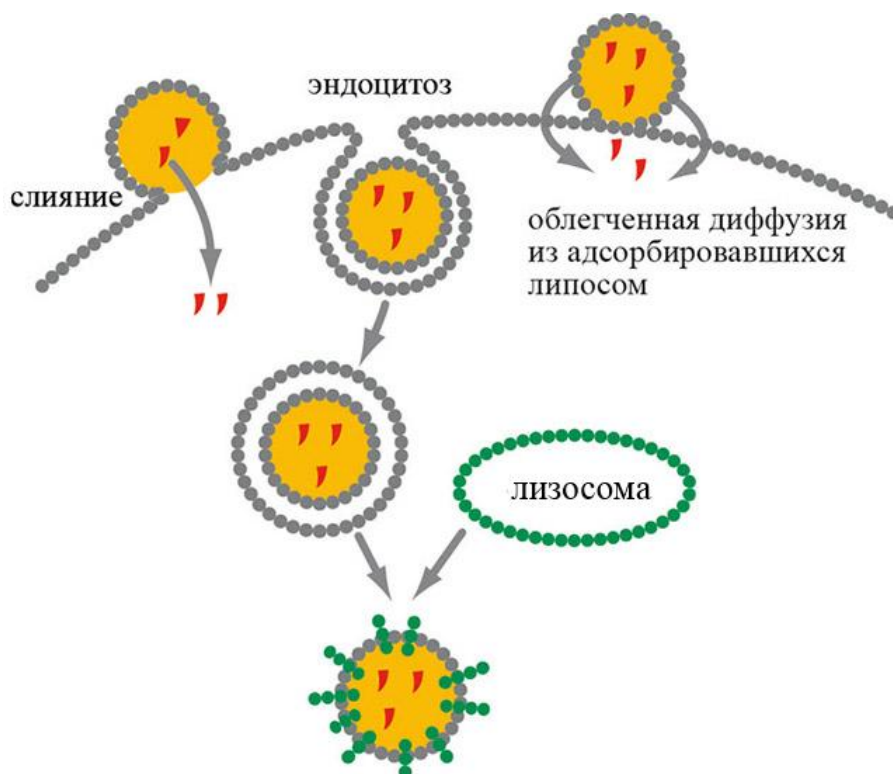


Рис. 8. Способы проникновения содержимого липосом в клетку

Также мембрана липосом может «откупориваться», т.е. в ней образуются «дырки», через которые ЛС будет выделяться в окружающую среду (рис. 9). После освобождения от ЛС мембрана липосом восстанавливается



Рис. 9. Электронная микрофотография «откупоренных» липосом

При использовании конъюгатов «наночеситель – лекарственное средство», в которых ЛС ковалентно связано с носителем, высвобождение ЛС происходит путём разрыва химических связей, удерживающих ЛС на носителе. Стоит также отметить, что возможно действие всего конъюгата и без разрыва химических связей

3.4. Разработка липосомальной формы лекарственных средств с адресной доставкой

В 1970-х гг. основными факторами, стимулировавшими развитие систем доставки лекарственных средств на основе липосом, стало использование трёх ключевых методов.

Первый метод – это покрытие липосом полиэтиленгликолем. Такое покрытие сделало липосомы более защищенными от ретикулоэндотелиальной системы за счет снижения узнаваемости их макрофагами, что позволило замедлить процесс выведения липосом из организма. Полиэтиленгликоль создает также повышенное осмотическое давление вокруг липосомы, препятствующее приближению других клеток. В результате *ПЭГилированные*

липосомы дольше циркулируют в крови, накапливаются в опухолевых тканях в большем количестве, чем обычные липосомы.

Второй метод – применение антител в качестве векторов, что обеспечило возможность адресной доставки ЛВ за счёт взаимодействия закреплённого на частице антитела с рецептором на клеточной мембране. Первые попытки создания таких липосом были неудачными, так как липосомы быстро выводились из крови. После увеличения времени циркуляции в крови (благодаря предыдущему открытию – покрытию полиэтиленгликолем) стало возможно создание *иммунолипосом* – липосом, к поверхности которых прикреплены полиэтиленгликоль и антитела. Доставка в опухолевые клетки происходит через опосредованный *моноклональными антителами* (МКА) *эндоцитоз*.

Третий метод появился благодаря открытию *эффекта ППН*. Этот эффект связан с тем, что *эндотелиальные клетки* опухолевых сосудов *пролиферируют* в 30-40 раз быстрее, чем эндотелиальные клетки сосудов нормальных тканей, поэтому для капилляров опухолей характерны большие поры. Эти поры стали использовать для пассивной доставки (см. рис. 6, а) липосомального препарата в опухоль.

Иммунолипосомы можно разделить по характеру прикрепления антител и полиэтиленгликоля к поверхности липосом (рис. 10).

Сначала иммунолипосомы получали прикреплением антител непосредственно к поверхности липосом посредством короткого якоря (тип А), но они не были эффективны из-за быстрого выведения из организма. Иммунолипосомы типа Б – это ПЭГилированные липосомы, в которых антитела также ковалентно связаны с ними посредством короткого якоря; они были более эффективны за счёт увеличения времени циркулирования их в крови. Но недостатком являлось снижение связывания липосом с клетками из-за наличия полиэтиленгликоля на поверхности липосом. Иммунолипосомы типа В (Pendant-type PEG-immunoliposomes) – это стерически

стабилизированные ПЭГлипосомы, в которых антитела прикреплены к дистальному терминальному концу ПЭГ. Они наиболее эффективны и распространены.

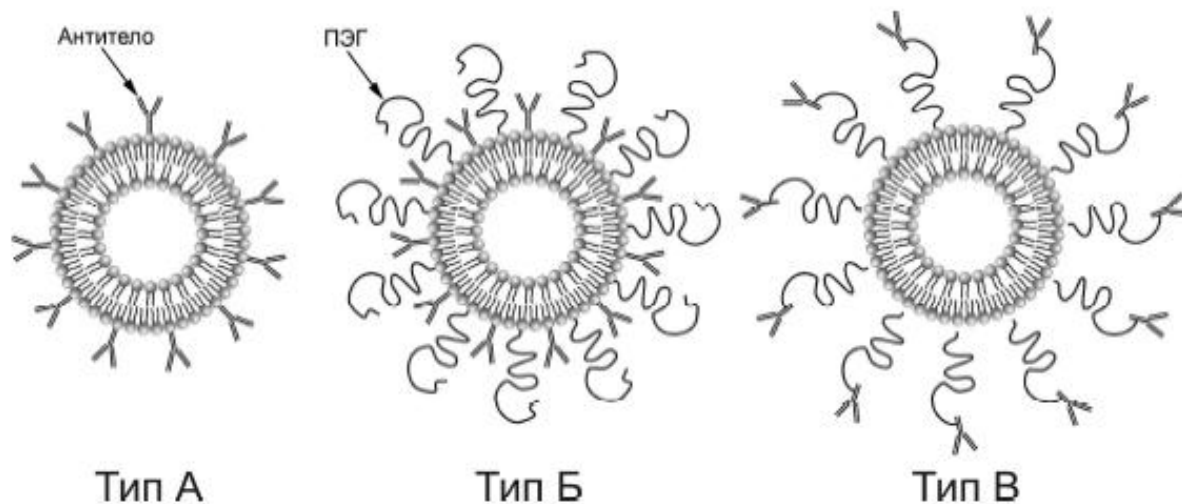


Рис. 10. Различные способы прикрепления антител и полиэтиленгликоля к поверхности липосом

На основе липосом созданы новые формы лекарственных препаратов. Из 56 представленных в табл. 2 препаратов 25 препаратов успешно прошли клинические испытания и достигли рынка. Широкое применение коммерческих препаратов на основе липосом сдерживается пока их высокой стоимостью.

Таблица 2

Разработанные липосомальные формы лекарственных препаратов

Наименование препарата	Компания-производитель	Лекарственная субстанция	Основное фармакологическое действие	Стадия изучения
AmBisone	NeXstar Pharmaceuticals, США	Амфотерицин В	противогрибковое	коммерческий препарат
Daune-Home	NeXstar Pharmaceuticals, США	Доксорубицин	противоопухолевое	="="
Vinca-Home	NeXstar Pharmaceuticals, США	Винкристин	противоопухолевое	1 – 2 фаза

Наименование препарата	Компания-производитель	Лекарственная субстанция	Основное фармакологическое действие	Стадия изучения
MiKasome	NeXstar Pharmaceuticals, США	Амикацин	антибактериальное	2 – 3 фаза
Doxil	Alza Pharmaceuticals, США	Доксорубин	противоопухолевое	коммерческий препарат
Amphocil Amphotec	Alza Pharmaceuticals, США,	Амфотерицин В	противогрибковое	=''=
Cuelyx	Schering-Plough, Бельгия	Доксорубин	противоопухолевое	=''=
Myocet	Elan Pharma, США	Доксорубин	противоопухолевое	=''=
Ampholip	Elan Pharma, США	Амфотерицин В	противогрибковое	=''=
Липин	Биолек, Харьков, Украина	Фосфатидил-холин	антигипоксическое, антиоксидантное, мембрано-протекторное	=''=
Липодокс	Биолек	Доксорубин	противоопухолевое	=''=
Лиолив	Биолек	Антраль	гепатопротекторное	=''=
Липофлафон	Биолек	Кверцетин	кардиопротекторное, антиоксидантное	=''=
Липофлафон	Биолек	Кверцетин	ранозаживляющее, ангиопротекторное, противовоспалительное	=''=
Липоплат	Биолек	Цисплатин	противоопухолевое	закончены клинические испытания
Липотакс	Биолек	Доцетаксел	противоопухолевое	доклиническое изучение
Visudyn	Novartis Pharma, Франция	Вертепорфирин	для фотодинамической терапии	коммерческий препарат
Abelcet	Liposome Company, США	Амфотерицин В	противогрибковое	=''=
Evacet, внутривенно	Liposome Company, США	Доксорубин	противоопухолевое	3 фаза
Ерахол-Berna Vaccine, внутримышечно внутривенно	Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцария	Антиген гепатита А	противовирусное	коммерческий препарат

Наименование препарата	Компания-производитель	Лекарственная субстанция	Основное фармакологическое действие	Стадия изучения
Inflexal virosomal Influenza Vaccine	Swiss Serum Vaccine Institute	Гемагглютинин, нейраминидаза	противовирусное	=”=
НераХen Combintd	Swiss Serum Vaccine Institute	Антиген гепатита В	противовирусное	=”=
Diphtheria/Tetanus	Swiss Serum Vaccine Institute	Дифтерийный и столбнячный анатоксины, антиген гепатита А	противовирусное, антибактериальное	1 – 2 фаза
Hepatitis A / B Tetanus Diphtheria vaccine	Swiss Serum Vaccine Institute	Дифтерийный и столбнячный анатоксины, антиген гепатита А	противовирусное, антибактериальное	1 – 2 фаза
Lipovaca Influenza Vaccine	Болгария	Гемагглютинин, нейраминидаза	противовирусное	коммерческий препарат
Nyotron	Aronex Pharmaceuticals, США	Нистатин	противогрибковое	2 – 3 фаза
Atragen	Aronex Pharmaceuticals	Ретиноевая кислота	противоопухолевое	2 – 3 фаза
<i>E.coli</i> 0157: H7, вакцина	Novovax Inc, США	<i>E.coli</i> 0157: H7 антиген	антибактериальное	1 фаза
Sh. Flexneri 2A, вакцина	Novovax Inc.	Sh. Flexneri 2A, антиген	антибактериальное	1 фаза
Tears again	Novovax Inc.	Природные фосфолипиды	при синдроме сухого глаза	коммерческий препарат
LE-M	NeoPharm, США	Митоксантрон	противоопухолевое	1 – 2 фаза
LE-P	NeoPharm	Паклитаксел	противоопухолевое	1 – 2 фаза
LE-SN38	NeoPharm	Метаболит иринотекана	противоопухолевое	1 – 2 фаза
SPI-077	Alza Pharmaceuticals, США	Цисплатин	противоопухолевое	1 – 2 фаза
SPI-077-B-103	Alza Pharmaceuticals	Цисплатин	противоопухолевое	1 фаза
SPI-119, в/в	Alza Pharmaceuticals	СД-4	противоопухолевое	доклиническое изучение
VSLI onco TCS, в/в	Nana Biosciences, Inc.	Винкристин	противоопухолевое	2 фаза

Наименование препарата	Компания-производитель	Лекарственная субстанция	Основное фармакологическое действие	Стадия изучения
Invivac virosomal Influenza, вакцина	Solvay	Поверхностный антиген гриппа	противовирусное	коммерческий препарат
Липоферон	Jadran	Интерферон альфа	противовирусное	="="
EndoTAG-1	MediGene AG, Германия	Паклитаксел	противоопухолевое	3 фаза
Доцетаксел	MediGene AG	Доцетаксел	противоопухолевое	Доклиническое изучение
Иринотекан	MediGene AG	Иринотекан	противоопухолевое	="="
Камптотецин	MediGene AG	Камптотецин	противоопухолевое	="="
Метотрексат	MediGene AG	Метотрексат	противоопухолевое	="="
Цисплатин	MediGene AG	Цисплатин	противоопухолевое	="="
Aroplatin	Antigenics Ins., США	Цисплатин	противоопухолевое	2 – 3 фаза
ThermaDox	Gelson, США	Доксорубин	противоопухолевое	1 – 2 фаза
Liporlatin	Regulon Inc., США	Цисплатин	противоопухолевое	3 фаза
Lipoxal		Оксалиплатин	противоопухолевое	2 фаза
Мерпакт	IDM Pharma, США	Мупамил трипептид	иммуноадьювантное при химиотерапии	коммерческий препарат
DepoCyt	Enzon Pharmaceutical Inc., США	Цитарабин	противоопухолевое	="="
Нанокорт	Galapagos, Бельгия	Преднизолон	лечение ревматоидного артрита, рассеянного склероза	3 фаза
Липосом-форте Трикортин-1000	Fidia Farmaceutical, SPA, Италия	Фосфолипиды нервной ткани	нейротропное	коммерческий препарат
LipoHer	Польша	Гепарин	антикоагулянтное, противоотечное	="="
Виатромб	Фабрил Фарма, Германия	Гепарин	антикоагулянтное, противоотечное	="="
Fluidosomes	Axentis Pharma, Швейцария	Тобрамицин	антибактериальное	="="

Липосомы обладают такими преимуществами как биосовместимость, биodeградируемость, нетоксичность, защита содержащегося внутри них

вещества от контакта с биологической средой. Кроме того, они могут обеспечивать доставку содержимого липосом в клетку при слиянии их мембраны с клеточной. Также липосомы постепенно высвобождают лекарственное вещество, что увеличивает его время действия.

3.5. Высвобождение лекарственного средства из системы доставки

До 1950-х гг. лекарственные средства изготавливали преимущественно в форме таблеток или капсул. При этом высвобождение ЛС не контролировалось, а определялось скоростью дезинтеграции лекарственной формы (ЛФ). Эта скорость зависела не только от физико-химических свойств ЛФ, природы вспомогательных веществ (таких как связующие, разрыхляющих, улучшающих сыпучесть гранул и др.) в таблетках, но и от индивидуальных особенностей пациента (температуры, величины рН биологических сред и др.). Системы же доставки должны контролировать высвобождение ЛС.

По одной из предложенных классификаций системы доставки ЛС можно разделить на три поколения. Критерием этой классификации служит способ доставки ЛВ и механизм его высвобождения.

Первое поколение систем доставки (1950-1980) началось с введения препарата с замедленным высвобождением. В 1952 г. компания «Smith, Kline & French» (SKF) представила препарат Декседрин (декстроамфетамин сульфат) с замедленным высвобождением ЛС. Лекарственное средство высвобождалось в течение 12 часов, что достигалось за счет использования биоразлагаемого полимерного покрытия.

Первое поколение систем доставки ЛС было сфокусировано на разработке препаратов для перорального и трансдермального типов введения с пролонгированным высвобождением ЛС из них в желудочно-кишечном тракте или в кожном покрове и прилегающих мышечных тканях. Преобладали такие экспериментальные способы контролируемого высвобождения ЛС, как растворение, диффузия, осмос.

В 1980-2010 гг. началась разработка второго поколения систем доставки ЛС. Основные усилия учёных были направлены на создание систем, в которых скорость выделения ЛС была бы постоянна во времени и не зависела от концентрации (высвобождение нулевого кинетического порядка). Впоследствии от этой идеи отказались, так как высвобождение нулевого порядка приводило к поддержанию постоянной концентрации в токе крови, а не, что особенно важно, в патологическом очаге.

В этот же период начали разрабатывать саморегулирующиеся системы доставки, которые основаны на использовании полимеров, чувствительных к изменению температуры и pH среды.

Основные проблемы систем доставки второго поколения были связаны с невозможностью преодолеть биологические барьеры. Стоит также отметить, что временной этап второго поколения систем доставки совпадает со временем бурного развития химии полимеров.

Главное внимание ученых при создании систем доставки третьего поколения сосредоточено на использовании нанотехнологий, в частности на целенаправленной доставке ЛС к опухолям и доставке генов с использованием различных наночастиц. Так как у большинства лекарственных веществ невысокая проницаемость через гематоэнцефалический барьер, то особый интерес вызывают наноносители, способные проникать в центральную нервную систему.

Глава 4. ПОДБОР НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

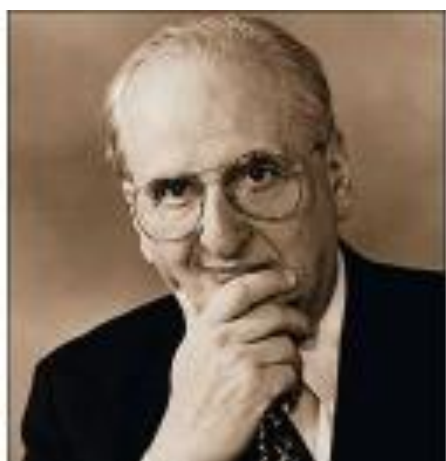
4.1. Носители, их достоинства и недостатки. Подход к подбору носителя

Несмотря на достоинства липосом транспорт с использованием их как носителей ЛС не является оптимальным. Так, липосомам сложно проникать в ткани с серьезными нарушениями микроциркуляции, они могут блокировать легочные капилляры (что приводит к *микровазкулярной эмболии*), могут вызывать повышение уровня глюкозы в крови, приводить к нарушению свертываемости крови и обмена холестерина. Поэтому основное внимание исследователей перешло на поиск других наночастиц в качестве платформ в системах доставки.

4.2. Нелипосомальные носители

4.2.1. Полимеры – носители в системах доставки

Использование полимеров в качестве носителей началось в 1960-х гг. В 1964 г. вышла статья Дж. Фолкмана «Использование силиконового каучука в качестве носителя для пролонгированного действия препарата». В этой работе исследована способность силиконового каучука поглощать красители из раствора и впоследствии их выделять. Дж. Фолкман предположил, что каучук



может поглощать и выделять также и другие вещества, в том числе и лекарства.

Джода Фолкман (1933 – 2008) – цитолог, онколог; известен своей теорией ангиогенеза новообразований, основанной на постулате о том, что ограничение кровоснабжения опухоли способно замедлить её развитие

Согласно классификации, предложенной А.С. Хоффманом, можно выделить три отдельных, но перекрывающихся подэтапа развития систем доставки на основе полимеров.

На первом этапе, так называемом «MACRO», начавшемся в 1960-х годах, полимеры использовали в макроскопических устройствах – имплантатах, пластырях и др. В качестве примера таких устройств можно привести офтальмологическую полимерную вставку «Ocuser», которая высвобождала препарат для лечения глаукомы пилокарпин. Она представляет собой резервуар с лекарственным средством пилокарпином, окруженный двумя контролирующими скорость высвобождения ЛС мембранами (рис. 11). Устройство помещается в нижнюю часть глаза, ниже роговицы. Однако его длительное пребывание в глазах пациентов может вызвать дискомфорт.

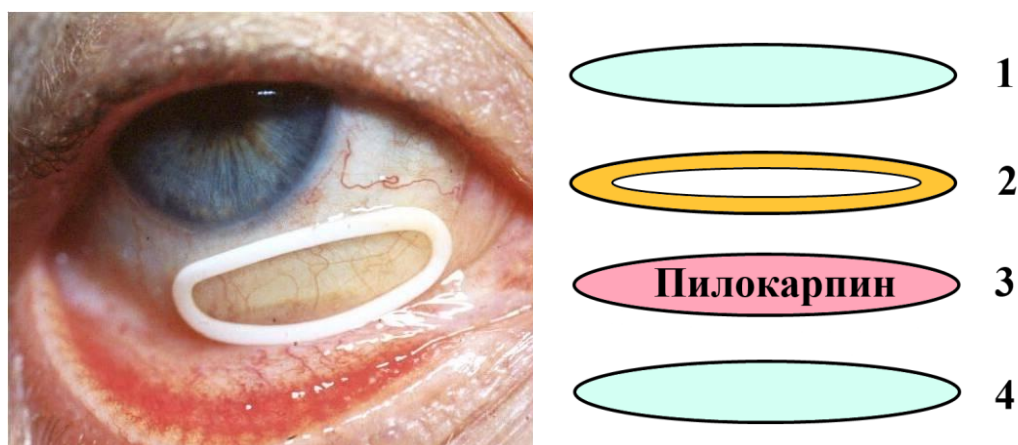


Рис. 11. Реальное и схематическое изображение устройства «Ocuser».

1 и 4 – контролирующие скорость высвобождения мембраны, состоящие из сополимера этилена и винилацетата; 2 – кольцо, удерживающее мембраны; 3 – мембрана-резервуар с лекарственным веществом пилокарпином

В 1970-х гг. Дж. Фолкман и его ученик Р. Лангер опубликовали статью, в которой показали, что белковые молекулы могут постепенно высвободиться из макроскопического гидрофобного полимера полиэтиленвинилацетата. Это стало примером успешного высвобождения ЛВ из неразлагаемой полимерной матрицы.

Второй «MICRO»–этап создания систем доставки начался в 1970-х годах и связан с использованием биоразлагаемых полимеров. Целью было использовать кинетику разложения полимера для высвобождения лекарственного средства в течение длительного времени. В 1967 г. Э. Шмитт и Р. Полистина синтезировали и запатентовали полигликолевую кислоту для применения в качестве разлагаемого шовного материала. Затем в фирме «Этикон» синтезировали разлагаемый сополимер молочной и гликолевой кислот. Он был зарегистрирован как шовный материал «Vicryl». В конце 1980-х гг. были получены коммерческие препараты, представляющие собой микрочастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот, высвобождающие LHRH (аналог лютеинизирующего гормона). Эти микрочастицы использовались в качестве терапевтического средства для лечения рака предстательной железы.

В 1975 г. Г. Рингсдорф предложил идею целевого конъюгата «полимер – лекарственное средство». Схематическое изображение этой биоразлагаемой и биостабильной макромолекулы представлено на рис. 12.



Гельмут Рингсдорф (р. 1929) – немецкий химик. Основная область его интересов – полимеры. Занимался самосборкой полимеров, известен тем, что первым предложил ковалентно связывать лекарства с водорастворимыми полимерами

Конъюгат включает три фрагмента. Первый фрагмент полимера нужен для того, чтобы делать макромолекулу растворимой и нетоксичной. Второй служит для фиксации терапевтического средства. Третий фрагмент выполняет роль вектора, ответственного за транспортировку макромолекулы к клеткам-мишеням.

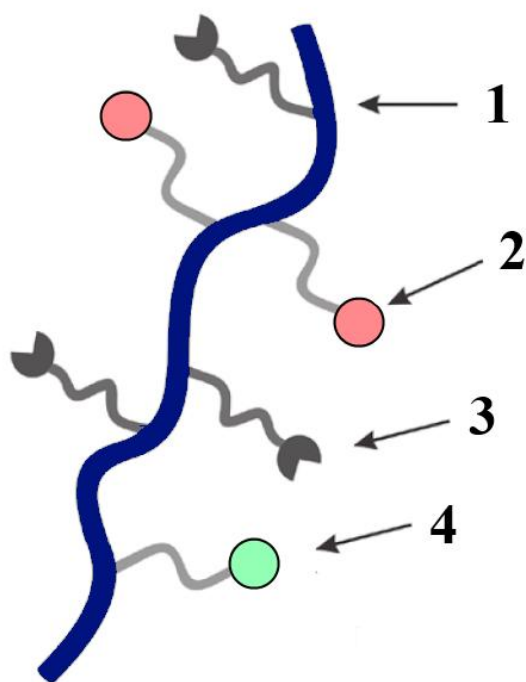


Рис. 12. Модель фармакологически активного конъюгата «полимер – лекарственное вещество». 1 – главная цепь полимера; 2 – фрагмент, отвечающий за терапевтический эффект; 3 – фрагмент обеспечивающий адресный транспорт в орган-мишень; 4 – фрагмент, обеспечивающий возможность отслеживания конъюгата

Третий «NANO»-этап начался с проникновения нанотехнологий в медицину (конец 1980-х годов) и продолжается в настоящее время (табл. 3).

Таблица 3

Исторические события в эволюции наномедицины

Год	Событие
1953	зарегистрирован первый патент на ЦД и их комплексы с ЛС
1954	Ф. Крамер впервые показал, что ЦД могут образовывать молекулярные комплексы включения с широким набором субстратов по типу «гость - хозяин», в которых молекулы ЦД с их внутренней гидрофобной полостью играют роль хозяев
1959	Американский ученый, лауреат Нобелевской премии Ричард Фейнман в лекции «Там, внизу, полно места!» обосновал неизбежность наступления века нанонауки
1965	А. Бэнгхем обнаружил липосомы
1974	Г. Грегориадис предложил включать в липосомы лекарственные препараты
1981	Эрик Дрекслер высказал идею о молекулярных машинах
1981	Карл Биннинг и Генрих Рорер изобрели сканирующий туннельный микроскоп (лаборатория ИВМ, Цюрих)
1984	Первое упоминание о дендримерах и методе получения полиаминоамидных дендримеров
1985	Г. Крото, Р. Кёрл, Р. Смолли открыли фуллерены

Год	Событие
1987	Норио Тонигучи впервые предложил термин «нанотехнологии»
1987	Использование для лечения рака моноклональных антител, конъюгированных с наночастицами
1995	FDA одобрило Doxil — липосомальный доксорубицин для внутривенного введения при лечении саркомы Капоши
2000	FDA одобрило препарат иммунодепрессант Rapamune на основе нанокристаллов
2005	FDA одобрило препарат Абрахан на основе наночастиц альбумина для лечения рака молочной железы
2012	Фирма «ProteusBiomedical» в сотрудничестве с аптечной сетью LloydsPharmacy объявила о выпуске на рынок Великобритании «цифрового медицинского продукта» Helius, представляющего собой электронные чипы в таблетированной форме для контроля состояния пациента

Наноразмерные полимерные частицы (*наноконтейнеры*, наносферы, дендримеры) нагружают лекарственными средствами либо путем абсорбции лекарственного средства, либо путем конъюгирования его с боковыми кислотными группами (рис.13), а концевые группы, например ОН–группы полиэтиленгликоля, связывают с векторными молекулами.

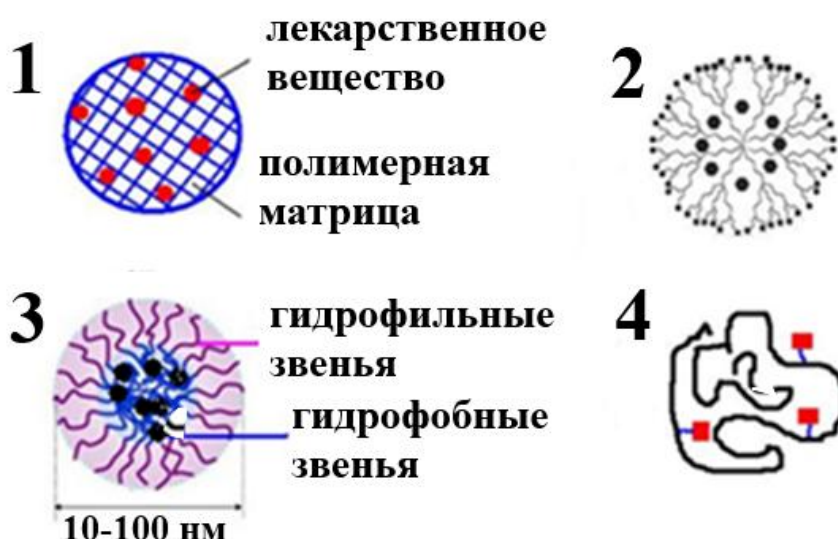


Рис. 13. Методы иммобилизации ЛС на полимерах. 1 – иммобилизованное ЛВ в полимерной матрице; 2 – полимерные мицеллы; 3 – конъюгаты ЛВ-полимер; 4 – дендримеры

Способы высвобождения лекарственного вещества из полимера подразделяются на физические и химические (рис. 14). При физическом способе высвобождение контролируется диффузией лекарственного средства или растворителя. Лекарственное средство помещается в контейнер со стенкой-мембраной. Скорость выделения его из диффузионно-контролируемых систем сильно зависит от физических свойств и размера молекул ЛС, а также от уровня нагрузки. Важное значение также имеют площадь поверхности мембраны и длина пути диффузии. Химический способ заключается в гидролитическом или ферментативном расщеплении основной цепи или отщеплении боковой цепи биоразлагаемого полимера.

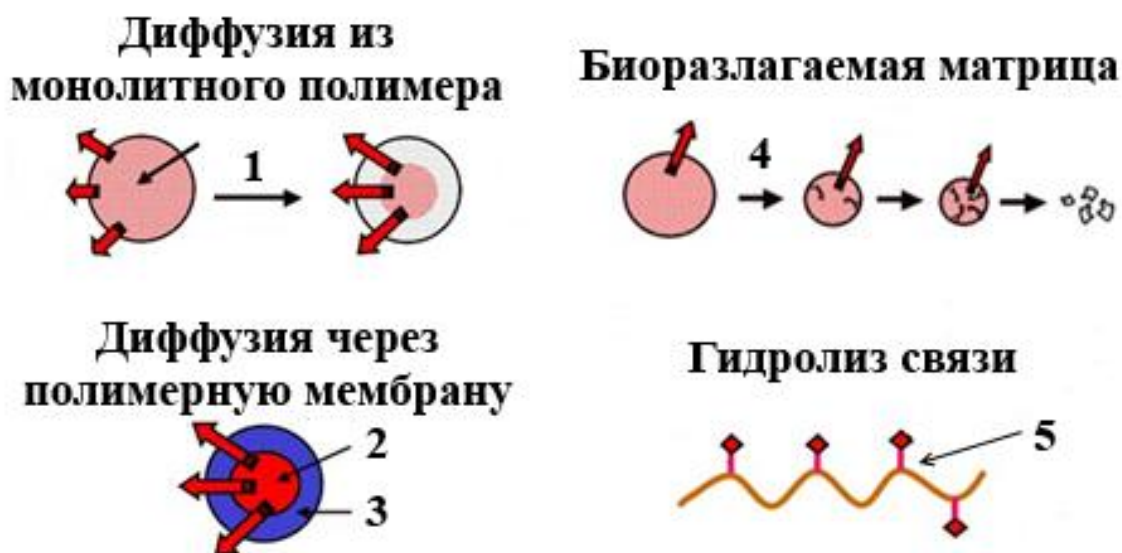


Рис. 14. Способы высвобождения ЛС из полимерных наноносителей. 1 – ЛС равномерно высвобождается из матрицы; 2 – ЛС внутри контейнера; 3 – мембрана определенными толщиной и коэффициентом диффузии; 4 – полимерная матрица разрушается и ЛС высвобождается из наноконтейнера; 5 – разрушение химической связи при изменении температуры или рН

При выборе полимеров в качестве носителей ЛС опираются на их физические свойства, от которых зависит скорость высвобождения ЛС. Так, предпочтительнее использовать гидрофобные полимеры, деструктурирующиеся до малых водорастворимых молекул, что обеспечивает их быстрый *клиренс*. При использовании же гидрофильных биодеструктурируемых полимеров из-за

их высокого сродства к воде при разрыве химических связей в окружающую среду переходят достаточно крупные молекулы, что осложняет их участие в обмене веществ.

Наиболее распространенными полимерами, используемыми в качестве платформ для создания систем доставки, являются полиэферы. Они биоразлагаемы, биосовместимы и легко разрушаются вследствие гидролиза сложноэфирной связи. Обычно используют полигликолевую и полимолочную кислоты и сополимеры молочной и гликолевой кислот (рис. 15).

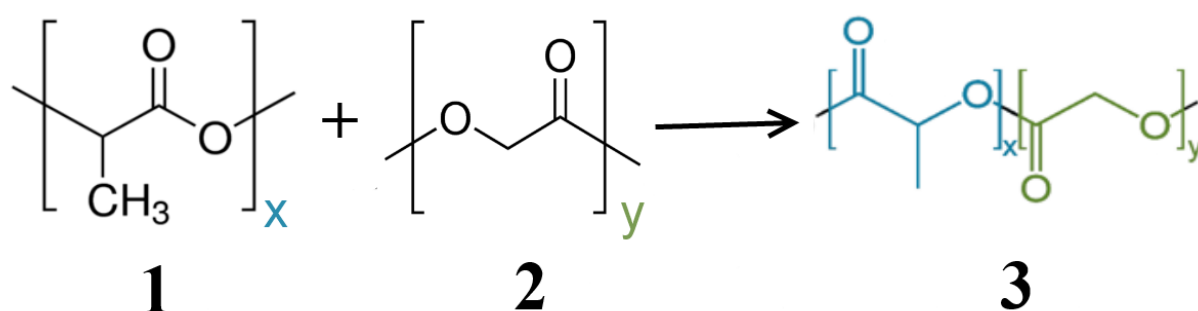


Рис. 15. Примеры биоразлагаемых полимеров для систем доставки: *a* – полимолочная кислота, *b* – полигликолевая кислота, *v* – сополимеры молочной и гликолевой кислот

Несмотря на биосовместимость и возможность биоразложения *in vivo* полимеры обладают недостатками, такими как недостаточная стабильность, трудности со стерилизацией и проблемы с расширением масштабов производства.

Один из современных вариантов полимерных наноносителей – дендримеры. Эти соединения впервые были получены в 70–80-х гг. прошлого века двумя группами ученых под руководством Ф. Вогтля и Д.А. Томалия.

Дендримеры получают дивергентным и конвергентным способом, либо их сочетанием (рис. 16).



Фриц Вогтль (1939 – 2017) – химик-органик, синтезировал первые дендримеры – полимеры с древовидной структурой



Дональд Томалия (р.1938) – американский химик, известный работами по синтезу дендримеров. Основатель компании «Dendritic Nanotechnologies Inc.»

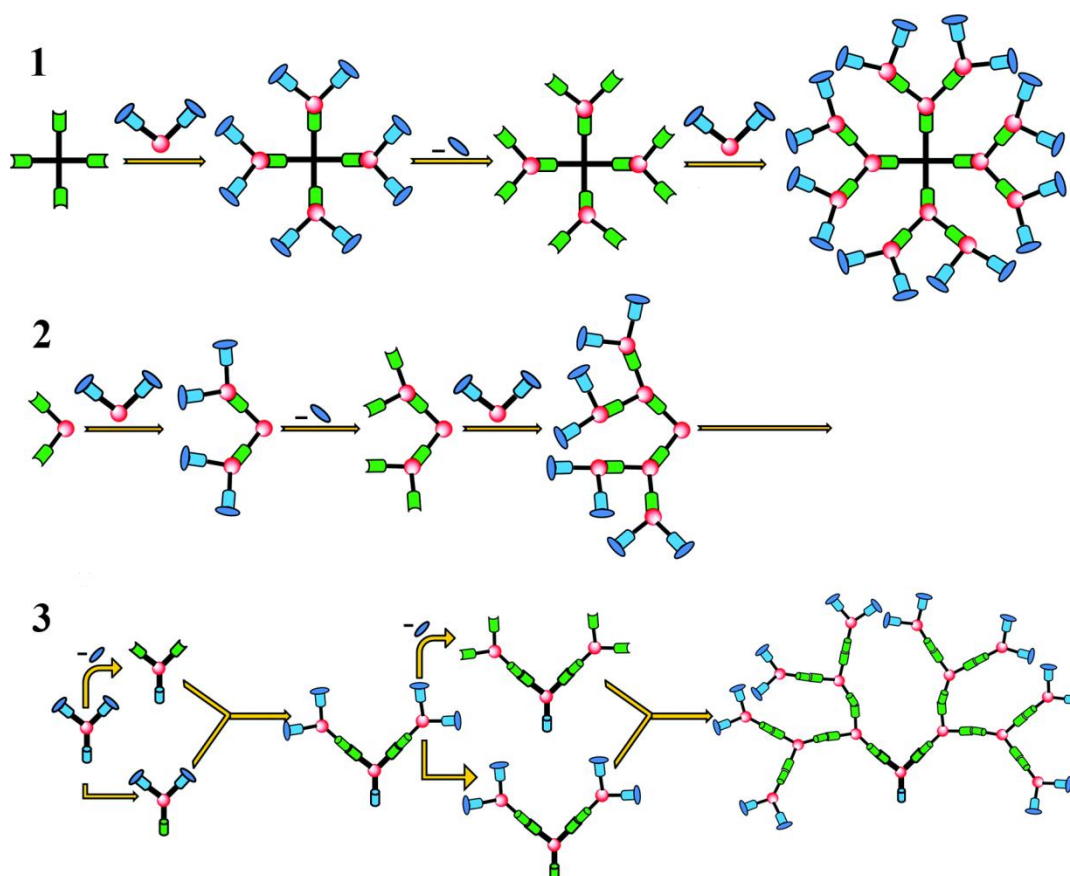


Рис. 16. Методы синтеза дендримеров. 1 – конвергентный; 2 – дивергентный; 3 – сочетание конвергентного и дивергентного способа

Наиболее часто используют полиамидаминные дендримеры (рис. 17).

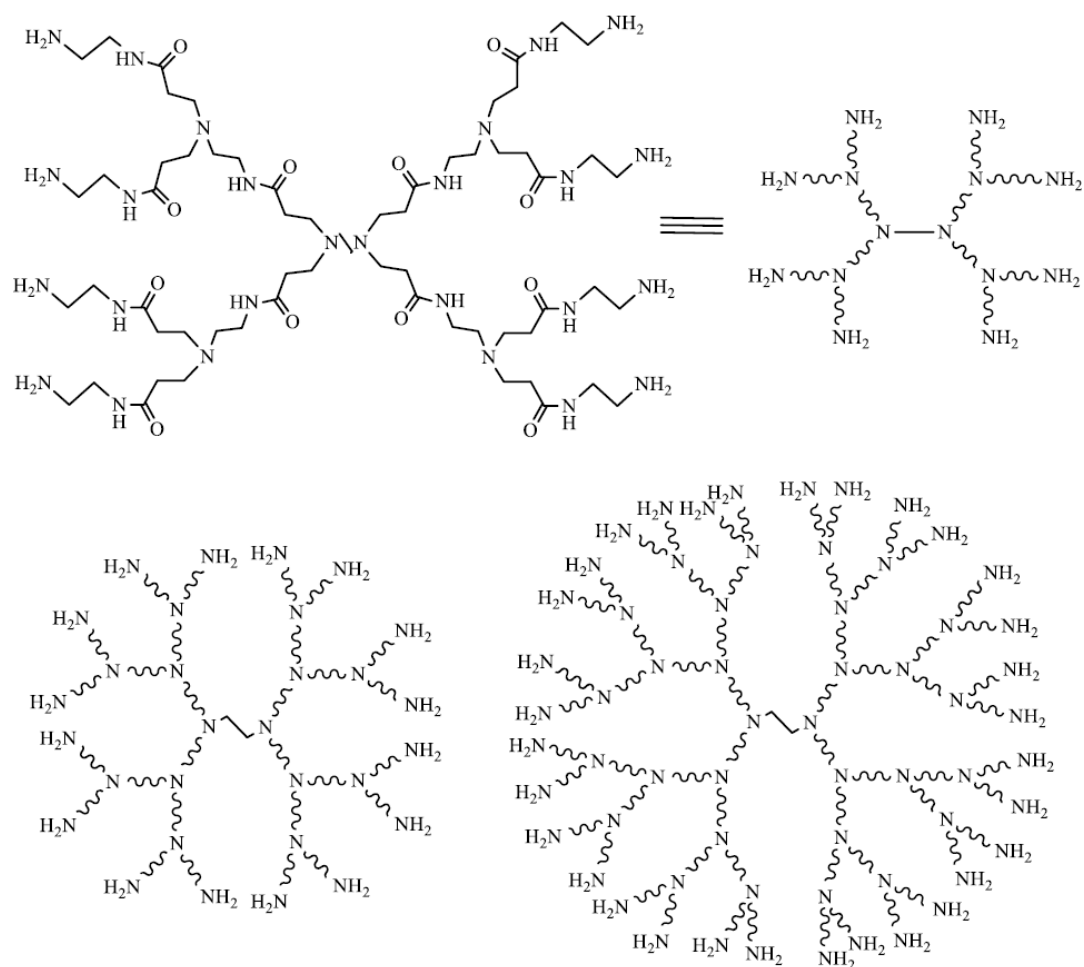


Рис. 16. Полиамидаминные дендримеры 1-го, 2-ого и 3-го поколений, на основе 1,4-диаминоэтана

Уникальность свойств дендримеров обусловлена радиальной симметрией их молекул, высокоупорядоченной структурой и древоподобным ветвлением. Они имеют размеры от 1,1 нм и выше в зависимости от числа стадий синтеза и строго фиксированную молекулярную массу.

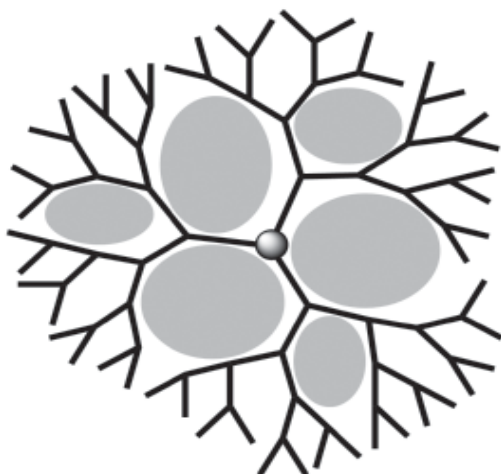


Рисунок 18. Схематическое изображение внутренних полостей дендримера, заполненных лекарством

Лекарственное средство инкапсулируют внутрь молекул дендримера (рис. 18), что повышает его растворимость и стабильность в физиологических условиях. Помимо этого к поверхности дендримеров можно прививать ЛС. Это делает применение дендримеров в качестве носителей для направленного транспорта многообещающим.

4.2.2. Циклодекстрины – молекулярные наноконтейнеры

Из множества видов исследованных наноразмерных частиц и материалов уже несколько десятилетий внимание исследователей привлекают *циклодекстрины* (ЦД), природные циклические олигосахариды, молекулы которых, в частности первых трех наиболее изученных представителей этого гомологического ряда, построены из шести, семи или восьми d-глюкопиранозных звеньев, связанных между собой 1,4-гликозидной связью и, соответственно, имеют названия α -, β - и γ -ЦД (рис. 19).

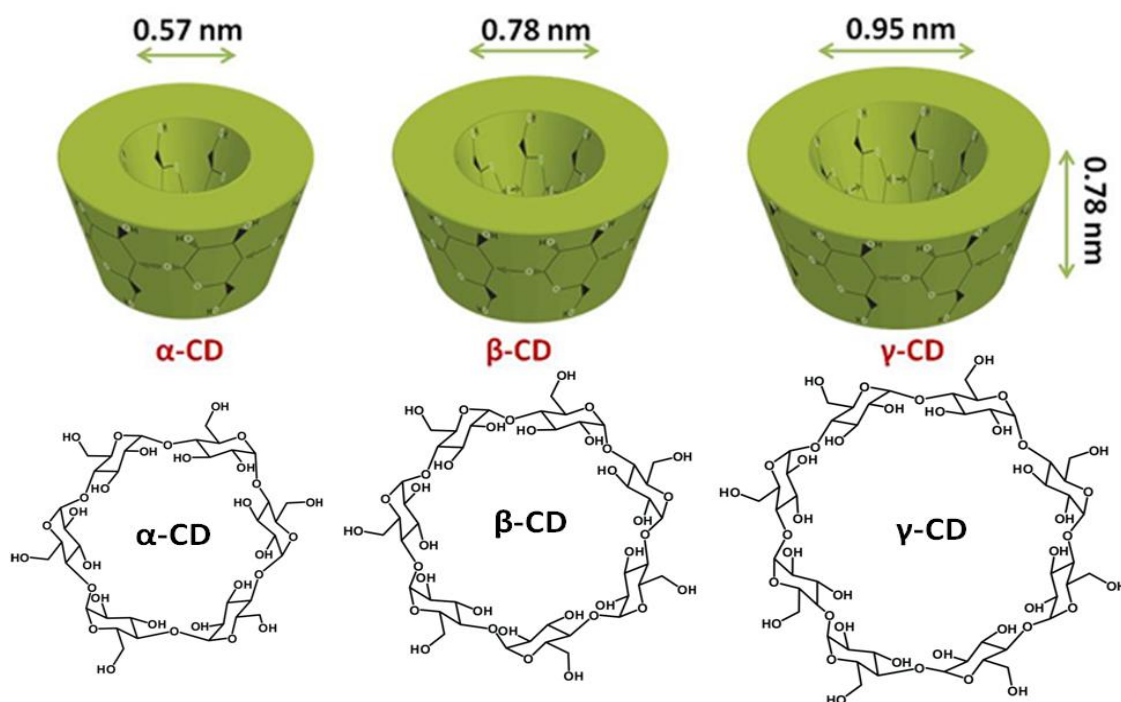


Рис. 19. Структурные формулы циклодекстринов и их геометрическое представление

Геометрически молекулы циклодекстринов имеют форму усеченного конуса (тора), полого внутри, в котором по окружности нижнего основания расположены 6-8 первичных OH-групп, а по окружности верхнего основания –

- 12-16 вторичных гидроксильных групп. ЦД представляет собой достаточно сложное образование, имеющее сквозную гидрофобную полость, с характерным чередованием зон полярности на внешней и внутренней стороне молекулы.

Циклодекстрины были открыты в 1891г. М.-А. Вилье, а первое подробное описание их получения из крахмала было дано в 1903. Ф. Крамер в 1954 г. впервые показал, что ЦД могут образовывать молекулярные комплексы включения с широким набором субстратов по типу «гость - хозяин», в которых молекулы ЦД с их внутренней гидрофобной полостью играют роль хозяев. Образование циклодекстринами комплексов включения способно радикально изменять физико-химические и биологические свойства включаемых молекул, что обусловило их востребованность в качестве объекта современных химико-фармацевтических технологий. Здесь ЦД играют роль своеобразных нанокапсул, служащих не только для хранения и транспорта молекул фармакологически активных молекул, но и позволяющих менять в желательную сторону агрегатное состояние инкапсулируемых соединений, получая из жидкостей и газов кристаллические вещества, снижать или полностью устранять их гидрофобность, на порядки повышать растворимость в воде.

Уникальная структура и физико-химические свойства ЦД обеспечивают им ряд преимуществ в системах доставки лекарств:

- наличие большого количества гидроксильных групп в молекулах ЦД позволяет проводить химическое модифицирование их;
- ЦД с различными объемами полости способны инкапсулировать гостевые молекулы различных размеров;
- ЦД относятся к биосовместимым и биodeградируемым веществам;
- ЦД и их производные способны многократно увеличивать растворимость трудно растворимых в воде препаратов и повышать их биодоступность;

- комплексообразование с ЦД предотвращает раздражающее действие препаратов на слизистые, снижает токсичность, маскирует неприятный вкус и запах, что важно при разработке лекарственных форм для детей;
- варьирование различных ЦД и их модифицированных производных, а также их комбинирование с другими носителями в системах доставки лекарств позволяют регулировать скорость и степень высвобождения препаратов;
- лекарственные средства, включенные в комплексы с ЦД и их производными, устойчивы к воздействию деструктивных факторов (окислению, ферментативному расщеплению, избыточной гигроскопичности твердых субстанций, улетучиванию и т.д.), что многократно повышает их стабильность и увеличивает гарантийные сроки хранения.

Недостатком многих препаратов на основе ЦД является быстрое снижение их концентрации в плазме крови после достижения пика вследствие метаболической деструкции в самом организме, что вызывает необходимость увеличения дозовых нагрузок и, соответственно, повышает вероятность развития побочных эффектов.

Известные лекарственные препараты в комплексах включения с молекулами ЦД или их химическими производными приобретают новые полезные свойства, не свойственные исходным, что усиливает их лечебный эффект. Первый патент на ЦД и их комплексы с ЛС был зарегистрирован в 1953 г., в настоящее время ЦД широко используются в фармацевтической промышленности. В табл. 4 приведены некоторые препараты (в виде комплексов с ЦД и их производными), хорошо известные на мировом фармацевтическом рынке.

Таблица 4

Коммерческие лекарственные препараты на основе
циклодекстринов и их производных

Субстанция, включенная в циклодекстрин	Торговое наименование	Лекарственная форма	Страна
α-циклодекстрин Алпростадил (PGE1) OP-1206 (Limaprost) Cefotiamhexetil*HCl (цефалоспорин)	Prostavastin, Rigidur Opalmon Pansporin T	Раствор для в/в введения Таблетки »»»	Япония, США Япония
β-циклодекстрин Venexate HCl Цефалоспорин (ME 1207) Хлордиазепоксид Дексаметазон Дифенгидрамин*HCl (димедрол) Йод Никотин Нимесулид Нитроглицерин Омепразол PGE2 Пироксикам Тиaproфеновая кислота	Ulgut, Lonmiel Meiact Transillium Glymesason Stada-Travel Mena-Gargle Nicorette, Nicogum Nimedex Nitropen Omebeta Prostamon E Brexin, Flogene Surgamyl	Капсулы Таблетки »»» Мазь Жевательные таблетки Раствор Таблетки сублингвальные Таблетки сублингвальные »»» »»» »»» Суппозитории »»»	Япония »»» Аргентина Япония Европа Япония Европа »»» Япония Европа Япония Европа »»»
2-Гидроксипропил-β- диклодекстрин Цизаприд Итраконазол Митомицин	Propulsid Sporanox Mitozytrex	Суппозитории Раствор для перорального и в/введения Раствор для в/в введения	Европа Европа, США »»»

Субстанция, включенная в циклодекстрин	Торговое наименование	Лекарственная форма	Страна
Метил-β-циклодекстрин Хлорамфеникол 17-β-Эстрадиол	Chlorocil Aerodiol	Глазные капли Назальный аэрозоль	Европа »»»
Сульфобутиловый эфир β-циклодекстрина Вориконазол Зипрасидон	Vfend Geodon, Zeldox	Раствор для в/в введения Раствор для в/м введения	Европа, США »»»
2-Гидроксипропил-γ-циклодекстрин Диклофенак натрия Tc-99 Teboroxime	Voltaren Cardiotec	Глазные капли Раствор для в/в введения	Европа США

4.2.3. Клетки крови – как платформы в системах доставки

Отдельного внимания заслуживает направление, в котором в качестве носителей используются природные контейнеры – *форменные элементы крови* человека или животных. Они обладают следующими преимуществами: широкий спектр объектов доставки, снижение иммуногенности и увеличение времени циркуляции лекарственного средства *in vivo*, биосовместимость, контролируемое высвобождение ЛС, а благодаря специфическим рецепторам на поверхности мембраны могут использоваться в целенаправленной доставке.

Системы доставки на основе клеток крови подразделяются на системы, использующие эритроциты, тромбоциты и лейкоциты.

Эритроциты – самая большая группа клеток крови, характеризующаяся более длительным сроком циркуляции по сравнению с другими клетками. Это сравнительно простые клетки, лишённые ядра, митохондрий и других

внутриклеточных включений. У эритроцитов имеется только цитоплазматическая мембрана, отделяющая цитоплазму от внешней среды, поэтому мембранные препараты, полученные из этих клеток, сравнительно однородны, не загрязнены другими мембранными элементами. Также все эритроциты обладают близкими размерами.

Первые попытки поместить химические соединения в эритроциты были сделаны в 1953 г.: молекулы АТФ ввели в так называемые «эритроцитарные тени». Эритроцитарные тени – это мембранные оболочки эритроцитов, их получают в ходе *гемолиза эритроцитов*, когда из них выходит гемоглобин. В 1973 г. описано успешное внедрение терапевтических препаратов в «эритроцитарные тени» для непосредственной доставки к органам-мишеням.

Методы загрузки ЛВ в эритроциты основаны на их способности деформировать свою поверхность без изменения ее площади. Самый распространенный способ включения ЛВ и различных наночастиц в эритроциты называется *гипоосмотический лизис*.

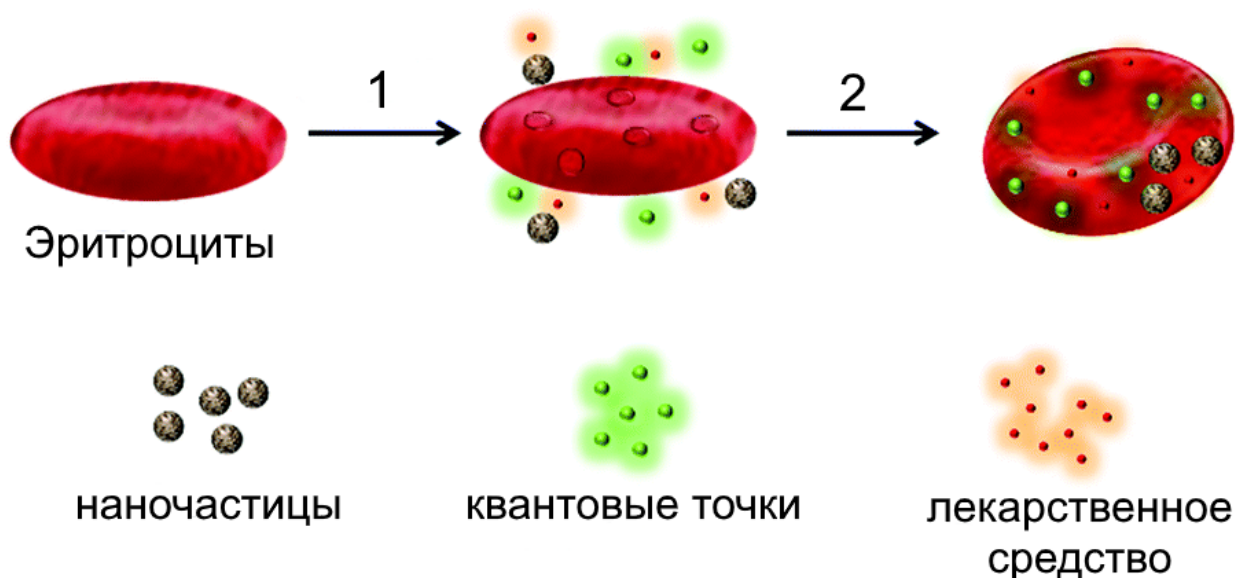


Рис. 20. Гипоосмотический лизис эритроцитов. 1 – сферуляция эритроцитов и открытие пор; 2 – запечатывание эритроцитов и отмывание

Эритроциты помещают в солевой раствор пониженной ионной силы. Лизису предшествует набухание клеток до достижения критического объема и

давления. Мембрана эритроцита лопается с образованием пор. Через образовавшиеся поры вещества, подлежащие включению, поступают из внешней среды внутрь эритроцитов. При восстановлении тоничности раствора до исходного уровня целостность поврежденной мембраны эритроцитов восстанавливается. Другой способ загрузки ЛС в эритроциты – метод электропорации. В этом способе смесь эритроцитов с ЛС в изотоническом растворе помещают в пульсирующее электрическое поле. Превышение трансмембранного потенциала приводит к временному образованию пор в мембране эритроцита.

Известны конкретные примеры использования эритроцитов в качестве носителей в системах доставки. Так, большое внимание уделяется транспорту эритроцитами антибактериальных препаратов.

Недостатком эритроцитов как носителей в системах доставки считается их большой объем (90 мкм³). Из-за этого эритроцит не может проникать внутрь тканей, и область его доставки ограничена только пораженными очагами, доступными для кровотока.

Тромбоциты имеют небольшой срок жизни (7-10 дней), но, несмотря на это, они также рассматриваются как перспективные носители ЛС. Важно, что тромбоциты специфически нацелены на места повреждений. Кроме того они содержат ряд биологически активных белков и при патологических процессах эти белки высвобождаются из тромбоцитов *экзоцитозом*. Благодаря этой особенности лекарственные вещества высвобождаются локально в местах активации тромбоцитов.

Лейкоциты по сравнению с другими клетками крови обладают следующими особенностями. Прежде всего – это их адгезионные свойства. При воспалительных состояниях лейкоциты могут прилипать к эндотелию, на котором находится белок Е-селектин, синтезирующийся в ответ на воспаление. Так, лейкоциты могут применяться в противоопухолевой терапии из-за их сходства с опухолевыми клетками по адгезивным свойствам. Помимо этого,

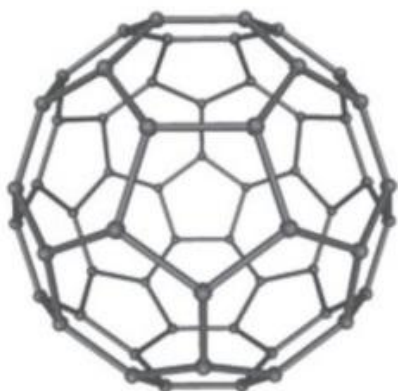
лейкоциты применяются в качестве носителя для направленного транспорта антибиотиков в очаг воспаления. Из-за замедленного высвобождения препарата из клеток в сосудистом русле период сохранения необходимой концентрации антибиотика удлиняется.

Однако, несмотря на важные достоинства носителей на основе элементов крови человека дальнейшее развитие таких систем доставки затруднено из-за невозможности крупномасштабного массового производства и ограничений в продолжительности сроков хранения.

4.2.4. Углеродные наночастицы

Среди разнообразных наноносителей ЛС наиболее перспективными считаются углеродные носители, такие как фуллерены, графен и его оксид, углеродные нанотрубки (УНТ) и детонационный наноалмаз (ДНА). Перспективы использования этих носителей обусловлены их физико-химическими характеристиками, возможностью целенаправленного модифицирования поверхности и варьированием размера частиц. Приняты два основных подхода для модифицирования поверхности носителей – адсорбция и ковалентная прививка.

Фуллерены представляют собой сферические молекулы, состоящие из



атомов углерода, связанных в шести- и

пятичленные циклы (рис. 21). Наиболее доступен

фуллерен C_{60} , который и рассматривается в

качестве кандидата для систем доставки.

Открытие фуллеренов произошло в 1985 г.

группой исследователей – Р. Кёрлом, Х. Крото, Р.

Смолли. Впоследствии в 1996 г. им была

Рис. 21. Структура фуллерена

C_{60}

присуждена Нобелевская премия с

формулировкой «за открытие фуллеренов».

Впервые использовать фуллерены как платформы для направленного транспорта предложил А.Д. Уотсон с коллегами. Вначале фуллерены

рассматривались как перспективные *контрастирующие агенты* для магнитно-резонансной томографии (МРТ). В этом случае использовали металлофуллерены – фуллерены с атомом металла, включенным внутрь молекулы. Такие комплексы повышают контрастность изображений магнитного резонанса. При использовании фуллеренов как носителей в химиотерапии сначала модифицируют поверхность наночастицы, а затем ковалентно прививают ЛС. Получены конъюгаты фуллерена с доксорубицином, паклитакселом и др. Эти конъюгаты показали усиление противоопухолевой активности препаратов.

К сожалению, имеются сведения об испытаниях, выявивших токсичность фуллерена C_{60} . При этом показано, что модифицирование поверхности фуллерена может как повышать, так и понижать его токсичность.

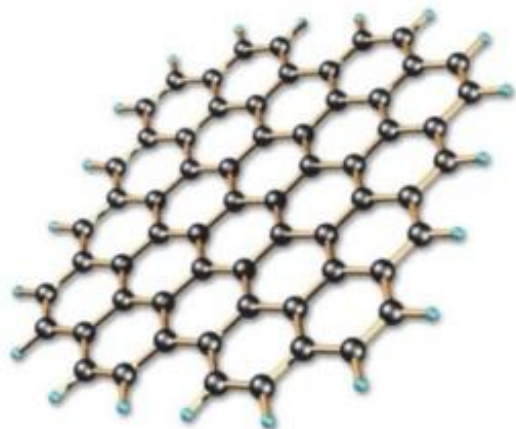


Рис. 22. Структура макромолекулы графена

Графен в настоящее время считается материалом, потенциально полезным для различных электронных и оптоэлектронных приложений, включая проводники, транзисторы, химические и биологические датчики. Он представляет собой единичный слой кристаллической решётки графита (рис. 22). За его открытие А. Гейм и К. Новоселов получили в 2010 г. Нобелевскую премию.

В качестве носителя в системах доставки ЛС предлагается использовать не сам графен, а его оксид. Это связано с возможностью химического модифицирования его поверхности. Оксид графена получают путём окисления графена смесью калия перманганата и серной кислоты. При этом на поверхности графенового листа образуются функциональные группы – гидроксильные ($-OH$), алкоксильные ($R-CH-O-CH_2$), сложноэфирные ($R_1-COO-R_2$), кетоновые ($C=O$) и карбоксильные ($-COOH$), что повышает

растворимость наночастицы в воде. Поскольку противоопухолевые препараты обычно нерастворимы в воде, оксид графена позволяет преодолеть этот недостаток. Он предложен в качестве платформы для доксорубицина, камптотецина, цисплатина и др. Также отмечено, что оксид графена может быть использован для отслеживания *ангиогенеза* опухолей. Описан конъюгат оксида графена с моноклональным антителом, который направленно связывается с опухолевыми клетками.

Однако, когда были проведены исследования токсичности графена, оказалось, что он и его производные могут быть опасны для биологических систем. Поэтому применение графена и его оксида в качестве носителя для систем доставки требует дополнительных токсикологических исследований.

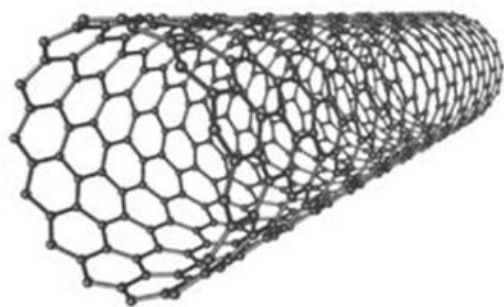


Рис. 23. Однослойная углеродная нанотрубка

Углеродные нанотрубки были открыты С. Идзима в 1991 г. УНТ – это искусственная модификация углерода, состоящая из одного или нескольких скрученных графеновых слоев и имеющая поэтому цилиндрическую структуру (рис. 23). Если трубка сформирована из одного графенового листа, то она

называется однослойной, если из нескольких – то многослойной. Известны два способа использования УНТ в качестве носителя: первый – прикрепление молекул ЛС к внешней поверхности трубки; второй – помещение молекул ЛС внутрь трубки, тогда она выполняет функцию контейнера.

УНТ, как и другие чистые углеродные материалы, имеют инертную гидрофобную поверхность, вследствие чего плохо диспергируются в воде, слипаются и образуют очень большие агрегаты. Поэтому поверхность УНТ химически модифицируют с образованием гидрофильных групп. Конъюгаты модифицированных УНТ с доксорубицином, паклитакселом, цисплатином и др. сохраняли фармакологическую активность ЛС и снижали их токсичность.

Однако получены данные о токсичности самих УНТ и их дальнейшее применение требует дополнительных исследований.

Наноалмаз является наиболее устойчивой углеродной наноструктурой с размером частиц 5 нм. Первичные частицы наноалмаза представляют собой сферы со средним размером 4-6 нм с алмазным ядром, нарушенной углеродной оболочкой и слоем функциональных групп (рис. 24).

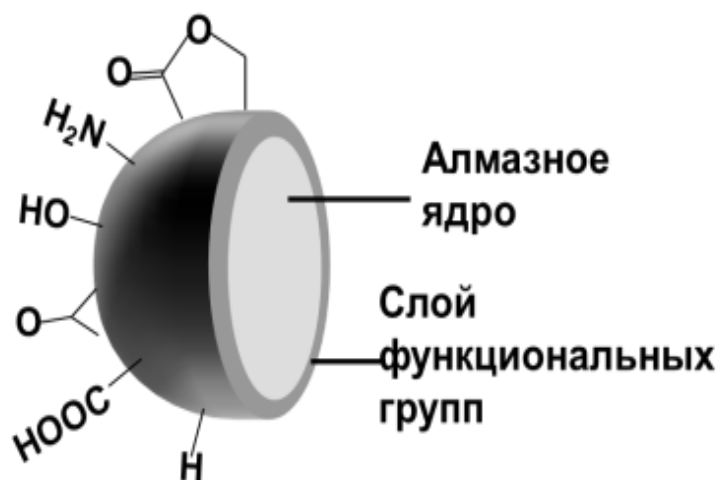


Рис. 24. Строение частицы наноалмаза

Наноалмазы были получены детонационным способом в 60-е гг. XX века в СССР, но публикации в открытой печати появились значительно позже, в 1990-е гг. Изначально его рассматривали как продукт чисто технического назначения из-за его высокой удельной площади поверхности. Его обычно используют для получения покрытий, в качестве добавок в полимеры, моторные масла и смазки.

Наноалмаз является перспективным носителем ЛС благодаря своим свойствам, таким как нетоксичность, биосовместимость, возможность прохождения через биобарьеры, стабильность, высокая концентрация различных поверхностных функциональных групп, развитая удельная поверхность (250-350 м²/г). К тому же налажено его промышленное

производство детонационным синтезом. Важно, что он наименее токсичен по сравнению с другими углеродными наночастицами.

В 1995 г. было предложено использовать наноалмаз как носитель белков. При этом поверхностно-модифицированные алмазные наночастицы (5-300 нм) обеспечивали конформационную стабилизацию молекул белка, а также высокую степень поверхностного воздействия белковых антигенов. В дальнейшем детонационный наноалмаз получил широкое распространение как носитель в разрабатываемых системах доставки из-за возможности модифицировать его поверхность. Рассматриваются два способа иммобилизации ЛС на поверхности детонационного наноалмаза: адсорбция на поверхности и ковалентное связывание с поверхностью наночастицы.

На поверхности наноалмаза адсорбировали доксорубин, паклитаксел, дексаметазон и др. У иммобилизованных ЛС наблюдается снижение токсичности, улучшение эффективности их действия. Также ЛС ковалентно прививали к поверхности ДНА; полученные конъюгаты проявляли аналогичные свойства.

Особый интерес представляют недавно полученные данные по активности конъюгатов «ДНА-глицин». Установлено, что по сравнению с глицином конъюгат обладает мощным постоянным седативным действием, не снижающимся в течение 24 ч (рис. 25).

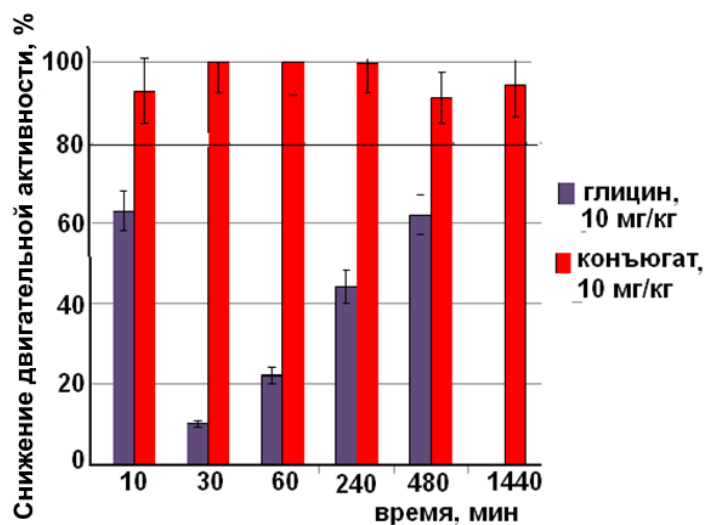


Рис. 25. Снижение двигательной активности мышей (в %) относительного контроля при введении глицина и конъюгата ДНА-глицин в дозах 10 мг/кг веса животного

Конъюгат ДНА-глицин даже в уменьшенной в 2 раза дозе превосходит глицин по антидепрессивному эффекту в тесте поведенческого отчаяния достоверно увеличивая время жизни животных (рис. 26).

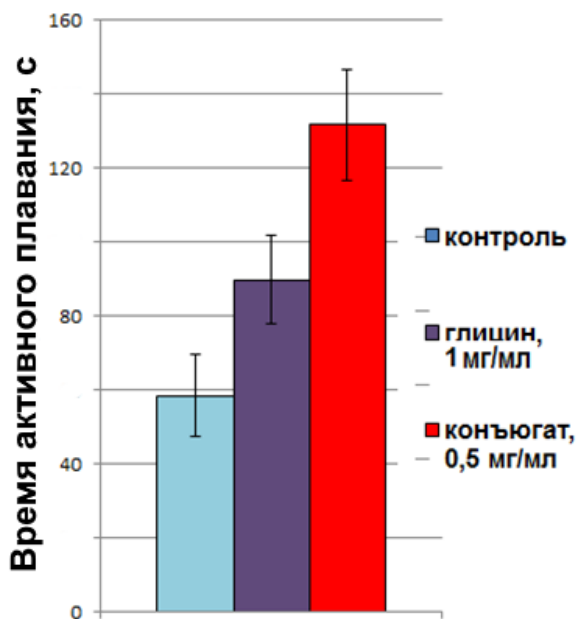


Рис. 26. Время активного плавания животных в тесте поведенческого отчаяния: контроль, глицин в дозе 1 мг/кг, конъюгат «ДНА-глицин» в дозе 0,5 мг/кг

Наиболее тяжелым осложнением различных заболеваний сосудов мозга является геморрагический инсульт (внутричерепное кровоизлияние), который возникает в любом возрасте. Было показано, что конъюгат ДНА-глицин в дозе 4 мг/кг обладает противоинсультным действием (табл. 5) и уменьшает смертность животных на модели геморрагического инсульта с 70 до 40 % и тяжелые последствия с 40 до 16 % .

При этом значительно снижается число тяжёлых нарушений после геморрагического инсульта (более чем на 80%), превышая даже эффективность действия применяемого в России препарата мексидол.

Проведенные исследования позволили установить, что конъюгат ДНА-глицин при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение семи дней

после инсульта обладает выраженным лечебным эффектом на модели геморрагического/ишемического инсульта, что выражается в уменьшении процента гибели животных после инсульта, ослаблении проявлений неврологического дефицита, координации движений и в улучшении нарушенных когнитивных функций и эмоционального статуса.

Таблица 5

Противоинсультное действие конъюгата «ДНА-глицин»

Группа крыс	Количество животных с нарушениями, % после операции, сут					
	легкими			тяжелыми		
	1	7	14	1	7	14
Интактные	0	0	0	0	0	-
Ложнооперированные	60	50	33	0	0	0
С геморрагическим инсультом	55,5	33	22	44,6	66,6	67
С геморрагическим инсультом + конъюгат	70	57	83	10	28	16
С геморрагическим инсультом + мексидол	66,5	57	43	22	43	28

4.2.5. Наночастицы металлов и оксидов

Коллоидные наночастицы золота также рассматриваются как перспективная платформа для создания систем доставки ЛС. Они легко синтезируются, биосовместимы, их поверхность может быть функционализирована. Наночастицы золота получают восстановлением кислоты золотохлороводородной натрия цитрата. Установлено, что можно контролировать размер наночастиц, изменяя концентрацию натрия цитрата. Кроме того, наночастицы золота нетоксичны и химически инертны. Связывать ЛС с наночастицами золота можно за счет ковалентных и нековалентных взаимодействий. Известны попытки использования наночастиц золота для

перехода через гематоэнцефалический барьер. Для этого их покрывали альбумином.

Отдельным направлением использования наночастиц золота является *фотодинамическая терапия*. В этом случае высвобождение ЛС происходит при внешнем воздействии – облучении. Так, конъюгаты ПЭГилированных золотых наночастиц обеспечивали высокую эффективность доставки гидрофобного препарата для фотодинамической терапии. Время доставки конъюгата с ЛС значительно сократилось по сравнению со временем доставки обычного. Такой способ лечения применяется в противораковой терапии. Изучено фотоуправляемое высвобождение противоопухолевого лекарства 5-фторурацила с поверхности наночастиц золота.

Другие наночастицы – смешанного оксида железа Fe_3O_4 – обладают парамагнитными свойствами и основное направление их использования – это визуализация магнитно-резонансных изображений и термотерапия рака (рис. 27). Преимущество оксидов железа заключается в управляемости их транспортирования с помощью внешнего магнитного поля, что обеспечивает их доставку к опухолевым клеткам и снижение побочных эффектов.

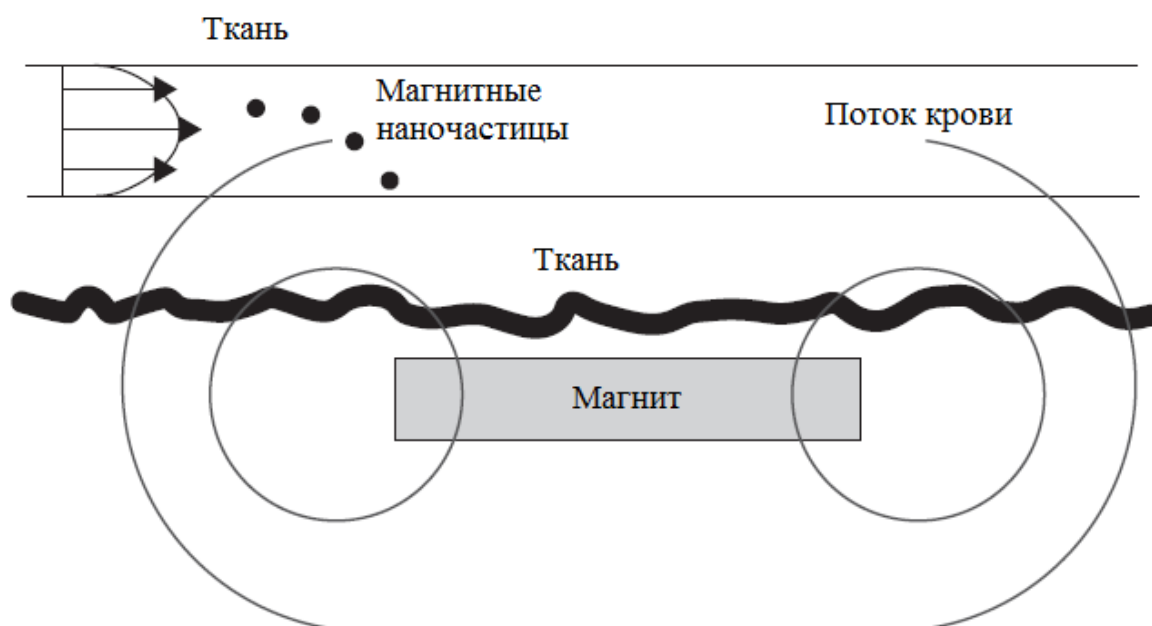


Рис. 27. Магнитоуправляемая система доставки

Для получения биосовместимых наночастиц оксидов их поверхность необходимо экранировать. Связывание ЛС с наночастицей проводят либо путем химического взаимодействия с поверхностью, либо путем включения молекулы ЛС в покрывающий слой.

Недостаток систем доставки на основе металлических наночастиц состоит в накоплении их в организме и возможности отдаленных токсических эффектов.

4.3. Системы доставки генов

Современный этап развития медицины характеризуется направленностью на создание принципиально новых препаратов для генной терапии, которая связана с лечением наследственных и приобретенных заболеваний путем введения в соматические клетки пациента генетических элементов для восстановления или подавления функций определенных генов и придания клеткам заданных свойств. Именно в этой области перспективно использование систем доставки.

Традиционный подход предполагает доставку нужного гена с помощью вектора. В доставке генов в мишень выделяют следующие этапы: получение гена, присоединение к нему вектора, доставку полученного конъюгата до клетки-мишени, получение трансформированных клеток и их отбор.

Для того чтобы осуществить успешную доставку гена в клетку-мишень вектор должен обладать способностью к *репликации*, содержать селективный маркер, который позволит отличать клетки с введенным геном, содержать *сайты рестрикции*. Наиболее распространенными векторами являются бактериальные плазмиды (рис. 28) и вирусы.

Плазмидный вектор содержит точку начала репликации (ORI) и ген для селекции рекомбинантных плазмид *amp^r*, который контролирует синтез фермента β-лактамазы, инактивирующего действие ампициллина. Участок для вставки экзогенной ДНК выделен скобкой. Вставка фрагмента ДНК в этот участок не нарушает репликацию *вектора* и *экспрессию* гена *amp^r*.

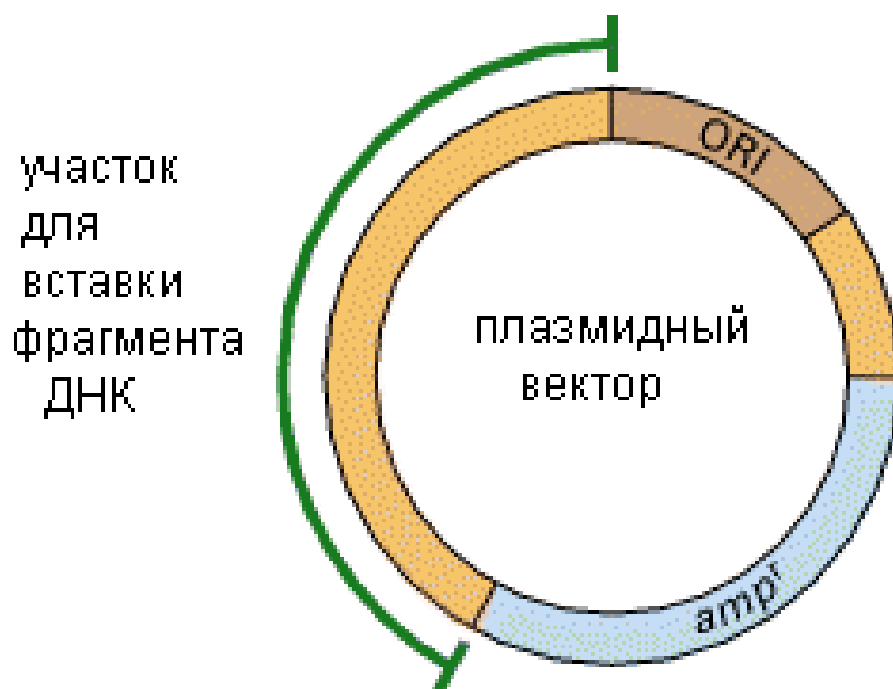


Рис. 28. Схема строения плазмидного вектора

Однако вирусные векторы обладают недостатками: они способны активировать онкогены и блокировать опухолевые супрессорные гены в инфицированных клетках, вызывать сильный иммунный ответ. Исследования в области генной терапии и, в частности, в создании эффективных систем доставки генов в настоящее время интенсивно развиваются.

Таким образом, рассмотренные в главе 4 данные позволяют заключить, что в качестве платформы для создания систем доставки лекарств можно использовать материалы в виде наноконтейнеров, наносфер или сплошных наночастиц. Сведения о таких материалах и размерах наночастиц представлены в табл. 6.

Таблица 6

Размеры некоторых нанообъектов, используемых или перспективных
для применения в медицине

Тип системы доставки	Наноноситель	Размер частиц, нм
Полимерные системы	Дендримеры	1-10
	Полимерные мицеллы	10-100
	Наночастицы	50-500
	Нанокапсулы	100-300
	Наноконъюгаты	1-15
	Полимерные наночастицы (хитозан, полиметилакрилат)	100-800
	Полимеросомы	100-300
Олигомерные системы	Циклодекстрины	10
Липидные системы	Твердые липидные частицы	50-400
	Аутосомы	10-1000
	Липидные наноструктуры	200-800
	Везикулы	10-150
	Липосомы	10-1000
Наноэмульсии	Кубосомы	50-700
Металлические наноструктуры	Наночастицы золота	100-200
	Магнитные коллоиды	100-600
	Наночастицы, покрытые золотом	10-130
	На основе оксидов металлов	10-50
Наноструктуры на основе углерода	Углеродные нанотрубки	1-10 (диаметр) 1-1000 (длина)
	Фуллерены	1-10
	Детонационный наноалмаз	5
Нанокристаллы	Аквасомы	60-300
Керамические структуры	На основе диоксида кремния	≈ 30
	На основе кальция фосфата	50-500
Биологические системы	Canine parvovirus	≈ 30
	Бактериофаг NK97	≈ 50

5. СОВРЕМЕННЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПРОГНОЗЫ

Для систематизации приведенных в настоящем пособии сведений рассмотрим основные этапы развития научного направления «разработка систем адресной доставки лекарственных средств» (табл. 7). Выделение этапов основано на определенных исторических событиях и открытиях в области химии, фармакологии и медицины. Следует иметь в виду, что этапы перекрываются, каждый из них (кроме первого и второго) продолжается до настоящего времени.

Таблица 7

Этапы создания систем доставки лекарственных средств

Начало этапа	Содержание этапа	Основные достижения
I этап ВОЗНИКНОВЕНИЕ ИДЕИ НАПРАВЛЕННОГО ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ		
Конец XIX века – начало XX века	Идея взаимодействия лекарства с мишенью	Д. Лэнгли, 1878 – сформулировал постулат о взаимодействии лекарственного вещества с рецепторами мишени.
	Введение понятия идеального лекарства Попытки получения лекарственных препаратов с использованием химии (сальварсан и сульфаниламидные препараты)	П. Эрлих: 1885 – теория «боковых цепей» у клеток (рецепторов), с которыми взаимодействует лекарство (взаимодействие агент – мишень). 1901 – теоретически обосновал химиотерапию (т. о., ввел химию в медицину). 1906 – концепция «волшебной пули» = идеального лекарства. Подбор лекарств путем изменения их молекулярной структуры: это более общая идея по отношению к направленному транспорту. 1910 – создание сальварсана (препарат 606).

Начало этапа	Содержание этапа	Основные достижения
		<p>1912 – создание неосальварсана (препарат 914).</p> <p>Г. Домагк, 1934 – открытие сульфаниламидных препаратов. Подтверждение предсказания П. Эрлиха о возможности создания лекарственных систем для избирательного поражения бактерий.</p>
II этап ПОЯВЛЕНИЕ ЭМУЛЬСИОННЫХ ПРЕПАРАТОВ		
1932 год	Создание нового типа фармацевтических препаратов	Д. Джонсон, 1932 – запатентовал новый препарат для инъекций в мышцы или подкожно на основе эмульсии.
III этап ОТКРЫТИЕ ЛИПОСОМ, ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВ		
		<p>Г. Грегориадис, 1974 – идея включения лекарств в липосомы.</p> <p>начало использования липосомальных наноконтейнеров.</p> <p>Создание липосомальных препаратов для местного введения.</p> <p>Модифицирование липосом: - ПЭГилирование - прививка антител - иммунолипосомы</p> <p>Дж. Матье, 1958 – привил антитело к лекарству (идея направленного транспорта).</p> <p>С. Мильштейн и Г. Келлер, 1975 – разработали способ получения антител, ввели термин «вектор».</p>

Начало этапа	Содержание этапа	Основные достижения
IV этап ПОИСКИ НОВЫХ ЭФФЕКТИВНЫХ НЕЛИПОСОМАЛЬНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ		
1953 – н. в.	Использование: полимерных носителей (мицеллы, наносферы, наноконтейнеры, наноглобулы, дендримеры); олигомерных (циклодекстрины)	<p>1953 – зарегистрирован первый патент на циклодекстрины и их комплексы с лекарственными средствами</p> <p>Дж. Фолкман, 1964 – предложил использовать полимеры.</p> <p>Э. Шмитт и Р. Полистина (фирма «Этикон»), 1967 – синтезировали и запатентовали биоразлагаемые полимеры.</p> <p>Г. Рингсдорф, 1975 – предложил идею целевого конъюгата «полимер-лекарственное вещество».</p> <p>Р. Вогтль и Д. Томалия, 1984 – первое упоминание о дендримерах и методе синтеза полиаминоамидных дендримеров.</p>
	Углеродные наноносители Начало XXI века – использование углеродных наноносителей в системах доставки лекарств.	<p>Е.И. Забабахин, В.В. Даниленко, 1960 – синтез детонационных наноалмазов.</p> <p>Р. Кёрл, Х. Крото, Р. Смолли, 1985 – открытие фуллеренов.</p> <p>С. Идзима, 1991 – получение углеродных нанотрубок.</p> <p>К. Новоселов, А. Гейм, 2004 – открытие графена.</p>
	Неорганические носители	<p>Оксидные наноносители.</p> <p>Металлические наночастицы.</p> <p>Магнитоуправляемые носители.</p>
	Форменные клетки крови	<p>Дж.М. Ихлер, 1958 – использование «эритроцитарных теней» в качестве носителей лекарственных веществ.</p> <p>Эритроциты.</p>

Начало этапа	Содержание этапа	Основные достижения
		Тромбоциты. Лейкоциты.
V этап СОЗДАНИЕ КОНЬЮГАТОВ «ЛЕКАРСТВЕННОЕ ВЕЩЕСТВО-НАНОСИТЕЛЬ»		
1975 – н.в.	Разработка методов синтеза конъюгатов «Носитель-Лекарственное вещество-Вектор»	Г. Рингсдорф, 1975 – предложил идею целевого конъюгата «полимер-лекарственное вещество». А.Д. Уотсон, 1994 – предложил использовать фуллерены в качестве платформ для систем доставки.
VI этап РАЗРАБОТКА КОММЕРЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ		
Начало XXI века	Доклинические и клинические испытания синтезированных конъюгатов	См. таблицу 2: из 56 представленных в таблице липосомальных препаратов 25 препаратов прошли клинические испытания, а затем достигли рынка (по данным на 2012 год).

От даты возникновения идеи направленного транспорта лекарств до нашего времени прошло более 110 лет. За минувшие годы в результате работы нескольких поколений учёных, внезапных озарений, частых неудач и редких успехов, многих тысяч кропотливых экспериментов идея стала реальностью. Сегодня в аптечных сетях разных стран можно купить лекарства, обладающие способностью к адресной доставке. Таких лекарственных препаратов пока ещё очень немного, их доля на фармацевтическом рынке вряд ли достигает нескольких процентов, но нет сомнений в том, что она будет постоянно расти.

Существенно, что практически все препараты, достигшие фармацевтического рынка, изготовлены по липосомальной технологии или с использованием циклодекстринов. Ещё большее число препаратов находится на стадиях доклинических и клинических испытаний (см. табл. 2).

Параллельно продолжают интенсивные научные исследования, направленные на разработку новых препаратов, в том числе на основе

нелипосомальных носителей, о чем свидетельствует неуклонный рост числа публикаций (рис. 28).

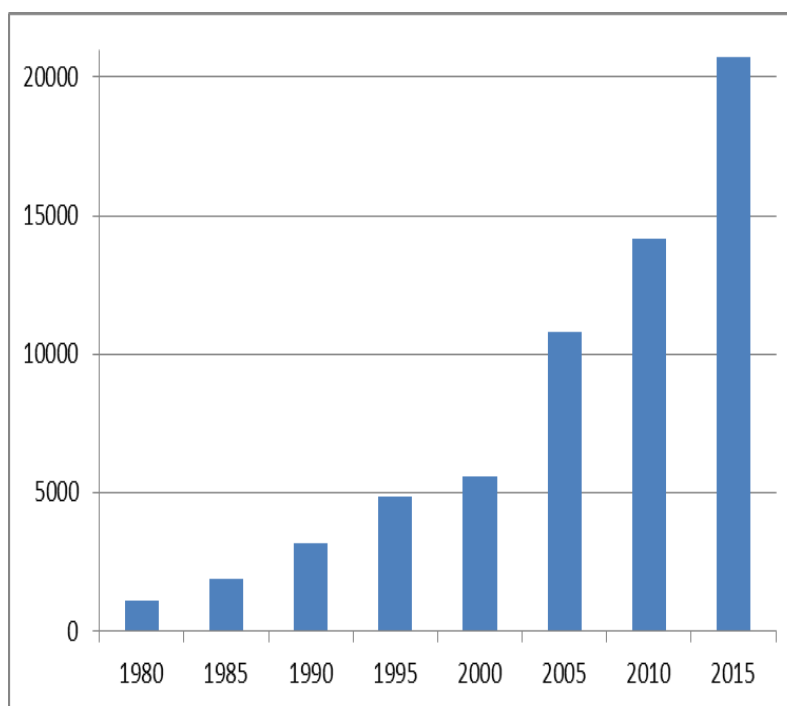


Рис. 28. Рост числа публикаций по системам доставки лекарств

Кроме достаточно очевидного прогноза о грядущем росте доли лекарств, обладающих способностью к адресной доставке, анализ литературы позволяет сделать и более конкретные прогнозы. Главные тенденции развития исследований в области направленного транспорта лекарств состоят в следующем.

- Разработка эффективных векторов.
- Разработка нелипосомальных носителей, обладающих низкой токсичностью. Так, использование форменных элементов крови привлекательно, но требует создания специальных подразделений в лечебных учреждениях, поскольку для каждого пациента нужно индивидуальное средство.
- Определение оптимума между величиной загрузки носителя лекарством и необходимым терапевтическим минимумом.

- Оптимизация методов высвобождения лекарств.
- Существенное повышение стабильности препаратов, увеличение срока их годности.
- Удешевление производства препаратов.
- Разработка законодательных норм в области регуляции, аттестации и соответственно производства систем направленного транспорта.

ОСНОВНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Инновационные технологии и оборудование фармацевтического производства / Н.В. Меньшутина [и др.]. – М.: Изд-во «БИНОМ», 2013. – Т.2. – 480 с.
2. Лампрехт А. Наноллекарства. Концепции доставки лекарств в нанонауке: пер. с англ. / А. Лампрехт; науч. ред. Н.Л. Клячко.- М.: Научный мир, 2010.- 232 с.
3. Лекарственные формы с модифицированным высвобождением и системы доставки лекарств: особенности фармакокинетики и клиническая эффективность / Ю.Б. Белоусов [и др.]. – М.: Литерра, 2011.- 656 с. - (Серия «Практические руководства»).
4. Наноалмазы в фармации и медицине: учебно-методическое пособие Р.Ю. Яковлев [и др.]; под общ. ред. Н.Б. Леонидова. – Рязань: РязГМУ, 2016.- 109 с.
5. Пейдж К. Фармакология: Клинический подход: пер. с англ. / К. Пейдж [и др.]; под ред. Б.К. Романова.- М.: Логосфера, 2012.- 744 с.
6. Тараховский Ю.С. Интеллектуальные липидные наноконтейнеры в адресной доставке лекарственных веществ / Ю.С. Тараховский.- М.: Изд-во ЛКИ, 2011.- 280 с.
7. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации: научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли / под ред. С.Н. Быковского [и др.]. – М.: Изд-во «Перо», 2015. – 472 с.
8. Журнал Всесоюзного Химического общества им. Д.И. Менделеева. Номер посвящен направленному транспорту лекарственных веществ. // 1987.- Т. 32.- № 5.- С. 485-533.
9. Росс. хим. журнал (Журн. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). Направленный транспорт лекарственных веществ //- 2012.- Т. 56.- С. 1-162.
10. Torchilin V.P. Liposomes as targetable drug carriers / V.P. Torchilin // Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.- 1985.- V. 2.- P. 65–115.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Абу Идда А.Ш. Лечение больных с гнойно-воспалительными заболеваниями почек путем применения направленного транспорта антибактериальных препаратов в аутологичных лейкоцитах / А.Ш. Абу Идда, С.И. Горелов, О.Ф. Каган // Медицинский научный и учебно-методический журнал.- 2006.- № 31.- С. 116–124.
2. Жумадилов Ж.Ш. Особенности включения некоторых антибиотиков в эритроцитарные тени – систему целенаправленной доставки химиотерапевтических препаратов / Ж.Ш. Жумадилов, Р.В. Макаренкова // Антибиотики и химиотерапия.- 1990.- Т. 35, №1.- С. 54–56.
3. Направленный транспорт лекарственных препаратов: современное состояние вопроса и перспективы / А.Г. Ивонин [и др.] // Известия Коми научного центра УрО РАН.- 2012.- № 1(9).- С. 46 – 55.
4. Перспективы применения наночастиц золота, серебра и оксида железа для повышения эффективности химиотерапии опухолевых новообразований / Т.А. Федотчева [и др.] // Химико-фармацевтический журнал.- 2015.- Т.49, №4.- С.11-22.
5. Полимеры для систем доставки лекарственных веществ пролонгированного действия (обзор). Полимеры и сополимеры молочной и гликолевой кислот / С.А. Кедик [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств.- 2013.- № 2.- С. 18-35.
6. Природные циклические олигосахариды – циклодекстрины в системах доставки лекарств / П.Ю. Федорова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана.- 2011.- С. 125-131.
7. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро- и наночастиц / А.В. Соснов [и др.] // Качественная клиническая практика.- 2008.- № 2.- С. 4-12.
8. Улашик В.С. Направленный транспорт лекарственных средств и лекарственные физические факторы / В.С. Улашик // Вопросы

курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2014.- №6.- С. 52-61.

9. Федеральный Закон «Об обращении лекарственных средств» №61-ФЗ от 12.04.2010.- М.,2010.

10. Яббаров Н.Г. Мультифункциональные дендритные молекулы: перспективы применения в медицине и биологии / Н.Г. Яббаров, Г.А. Посыпанова, Е.А. Воронцов // Молекулярная медицина.- 2012.- №6.- С.

11. Bangham A.D. Negative Staining of Phospholipids and their Structural Modification by Surface-active Agents as observed in the Electron Microscope / A.D. Bangham, R.W. Horne // J. Mol. Biol.- 1964.- №8.- P. 660-668.

12. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms / R.G. Mendes [et al.] // J. Mater. Chem. B.- 2013.- V. 1, № 4.- P. 401-428.

13. Cytodextrins in drug delivery / T. Loftsson [et al.] // Expert Opin. Drug Deliv.- 2005.- V. 2.-P.335-351.

14. Gregoriadis G. Drug entrapment in liposomes / G. Gregoriadis // FEBS Lett.- 1973.- V.36.- P.292–296.

15. Gregoriadis G. Enzyme-containing liposomes alleviate a model for storage disease / G. Gregoriadis, R.A. Buckland // Nature.- 1973.- P. 170–172.

16. Hoffman A.S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems / A.S. Hoffman // Journal of Controlled Release.- 2008.- V.132.- P. 153 – 163.

17. Mc Neil S.E. Nanotechnology for biologist / S.E. Mc Neil // J Leukocyte boil.- 2005.-V.78.-P. 1-10.

18. Perrie Y. Introducing liposomes to drug delivery / Y. Perrie, Gregory Gregoriadis // Journal of Drug Targeting.- 2008.- V.16,№ 7–8.- P. 518–519.

19. Yun Y.H. Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation / Y.H. Yun, B.K. Lee, K. Park // Journal of Controlled Release.- 2015.- V. 219.- P. 2-7.

20. Leong K.W. Polymeric controlled drug delivery / K.W. Leong, R. Langer // Advanced Drug Delivery Reviews.- 1987.- № 1.- P. 199-233.

21. Polymer micelles as novel drug carrier: Adriamycin-conjugated poly (ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer / M. Yokoyama [et al.] // *Journal of Controlled Release*.- 1990.- № 11.- P. 269-278.
22. Tomalia D.A. A new class of polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules / D.A. Tomalia // *Polymer Journal*.- 1985.- V. 17, № 1.- P. 117-132.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ И ОБСУЖДЕНИЯ НА СЕМИНАРАХ

1. Дайте определение системы адресной доставки лекарственных средств.
2. Почему системы адресной доставки лекарственных средств более эффективны, чем традиционные лекарственные средства?
3. Каковы недостатки традиционных лекарственных форм? Как их устраняют?
4. Что представляет собой идеальное лекарственное средство?
5. Чем знаменит Пауль Эрлих?
6. Что собой представляет водно-жировая эмульсия?
7. Когда и кем было предложено использовать эмульсионные лекарственные препараты?
8. Почему в эмульсии можно вводить много лекарственного средства и почему оно действует продолжительное время?
9. Что такое липосомы? Каково их строение? Типы липосом.
10. Преимущества липосом как носителей в системах доставки лекарственных средств.
11. Недостатки липосом. Способы модифицирования липосом.
12. Классификация липосом, что такое иммунолипосомы?
13. Требования к наноносителям, используемым в системах доставки лекарственных средств.
14. Какие нелипосомные носители используются для создания систем доставки лекарственных средств.
15. Охарактеризуйте циклодекстрины и их достоинства при разработке лекарственных форм с различным типом высвобождения лекарственных средств и как носителя в системах доставки.

16. Какие типы наноносителей используют в системах доставки лекарственных средств?
17. Механизм взаимодействия ЛС-мишень.
18. Структура систем доставки лекарственных средств. Какие функциональные фрагменты она включает?
19. Как обеспечивается адресная доставка?
20. Что такое вектор в системах доставки?
21. Что может служить вектором?
22. Сопоставьте углеродные наноматериалы по перспективности их использования в качестве носителей в системах доставки лекарственных средств.
23. Использование магнитоуправляемых частиц в в системах доставки лекарственных средств.
24. Преимущества и недостатки форменных клеток крови в качестве носителей для систем доставки лекарственных средств.
25. Как получают «эритроцитарные тени» Необходимо ли присоединять вектор к СДЛ на основе форменных клеток крови?
26. Как высвобождается лекарственное средство из систем доставки на основе липосом?
27. Объясните, что такое конъюгат «носитель-ЛС».
28. Оцените, сколько молекул доксорубицина может поместиться в гидрофобном ядре липосомы (его диаметр 10 нм), если молекула лекарства занимает объём $0,2 \text{ нм}^3$, а упакованы молекулы плотно.
29. Оцените, сколько молекул доксорубицина может поместиться на поверхности наночастицы золота, если её диаметр 10 нм, а площадка, занимаемая молекулой равна $0,5 \text{ нм}^2$ и молекулы доксорубицина образуют на поверхности наночастицы монослой.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Работа 1. Определение критической концентрации мицеллообразования в водных растворах ПАВ

Цель работы: определение критической концентрации мицеллообразования (ККМ) в водных растворах ПАВ.

Оборудование, посуда: для проведения работы необходимы:

прибор для измерения электропроводности растворов (+инструкция к нему),
фотоэлектроколориметр,
кювета с длиной оптического пути 1 см;
ультратермостат, водяная баня,
колбы мерные емкостью 200 мл, 7 штук,
промывалка,
штатив с пробирками,
ультразвуковая ванна;
химический стакан объемом 50 мл.

Реактивы: исследуемое ПАВ (натрия каприлат, натрия олеат),
краситель (пинацианолхлорид, или пинацианолиодид, 0,01%-ный раствор),
вода очищенная

От преподавателя студент получает указание, с каким ПАВ и с каким красителем проводить работу.

Введение

Термодинамически устойчивые дисперсные системы (ДС) образуются самопроизвольно при условии $\Delta G_{обр.} < 0$. Типичными примерами таких систем являются мицеллярные растворы ПАВ, микроэмульсии и критические эмульсии. Мицеллярные растворы ПАВ содержат наряду с индивидуальными молекулами (или ионами) агрегаты коллоидного

размера, состоящие из достаточно большого количества молекул (ионов), которые называются мицеллами.

В зависимости от природы растворителя и ПАВ мицеллы могут быть прямыми и обратными. В полярных растворителях (обычно в воде) самоорганизация молекул ПАВ приводит к образованию прямых мицелл, а в неполярных растворителях – обратных (обращенных) мицелл. Прямая мицелла состоит из гидрофобного ядра, образованного углеводородными цепями молекул (ионов) ПАВ и экранированного от растворителя полярными группами. В обращенной мицелле, наоборот, полярные группы формируют ядро, а углеводородные цепи молекул ПАВ находятся в неполярной фазе.

С увеличением концентрации ПАВ в водном растворе при критической концентрации мицеллообразования (ККМ) возникают прямые мицеллы, содержащие от нескольких десятков до нескольких сотен молекул (или ионов). Способностью к мицеллообразованию, в подавляющем большинстве случаев, обладают ПАВ, содержащие от 8 до 18 атомов углерода в углеводородной цепи (R). Когда концентрация ПАВ в растворе (c) меньше ККМ, вещество находится в мономерной форме. При $c > \text{ККМ}$ образуются мицеллы, дальнейшее увеличение концентрации приводит к росту концентрации агрегированного вещества (c_{mic}), тогда как концентрация неассоциированной формы (c_1) остается практически постоянной и равной ККМ.

Одним из основных свойств мицелл ПАВ является их способность самопроизвольно аккумулировать (*солюбилизировать*) малорастворимые в воде органические вещества, существенно повышая их растворимость в водной среде. Это явление называется *солюбилизацией*, растворяемое липофильное вещество – *солюбилизатом*, а ПАВ, формирующее мицеллы, – *солюбилизатором*. В зависимости от природы ПАВ и солюбилизата последний может располагаться в различных частях мицеллы (в

углеводородном ядре, во внешнем гидрофильном слое), либо при гидрофильном строении встраиваться в мицеллу, наряду с основным ПАВ. Природа солюбилизации в водных растворах ПАВ, в основном, имеет энтропийный характер, обусловленный гидрофобным эффектом. В ряде случаев, когда солюбилизат локализован в полярной части мицеллы вследствие специфических взаимодействий, вклад энтальпии также может быть существенным. В присутствии солюбилизата величина ККМ ПАВ может уменьшаться.

Определение ККМ основано на фиксировании резкого изменения какого-либо физико-химического свойства раствора ПАВ при изменении его концентрации. Выбор экспериментального метода зависит от природы ПАВ. Универсальными являются методы тензиометрии (измерения поверхностного натяжения), осмометрии, кондуктометрии, светорассеяния, солюбилизации красителя и т.д.

Кондуктометрический метод основан на измерении электропроводности водных растворов ПАВ в широкой области концентраций. Однако следует отметить, что он применим только для ионогенных ПАВ. Типичная зависимость удельной электропроводности (κ) от концентрации (c) раствора ПАВ приведена на рис. 1Л.



Рис. 1Л. Зависимость удельной электропроводности от концентрации для водных растворов ионогенных мицеллообразующих ПАВ

При ККМ наблюдается излом, т.е. скачкообразное уменьшение $d\kappa/dc$. Удельная электропроводность раствора зависит от числа кинетических единиц и их подвижности. При $c > \text{ККМ}$ уменьшение $d\kappa/d$ обусловлено меньшей подвижностью мицелл (по сравнению с ионами) и высокой степенью связывания противоионов мицеллами.

Метод определения ККМ по *солюбилизации красителя* основан на анализе спектров поглощения красителя в растворах ПАВ разной концентрации. Известно, что спектр поглощения некоторых красителей зависит от микроокружения молекул красителя, т.е. от полярности растворителя. Важно правильно подобрать пару ПАВ – краситель: краситель должен концентрироваться, т.е. солюбилизироваться в углеводородном ядре, и не должен уменьшать ККМ данного ПАВ в водной среде. В этом случае при $c < \text{ККМ}$ краситель находится в воде, а при $c > \text{ККМ}$ наблюдается солюбилизация его в мицеллах ПАВ. Если краситель солюбилизируется в углеводородных ядрах мицелл (неполярное микроокружение), наблюдается изменение максимума поглощения и окраски раствора.

Метод тензиометрии основан на измерении краевых углов при смачивании водными растворами мицеллообразующих ПАВ твердых поверхностей (например, пластин гидрофобных полимеров полиэтилена или политетрафторэтилена).

Порядок выполнения работы

1. Химическую посуду тщательно промыть хромпиком, затем водопроводной и очищенной водой.
2. Приготовить 200 мл раствора ПАВ (*по указанию преподавателя*) следующей концентрации: для натрия каприлата – 1, для натрия пальмитата – 0,02, для натрия олеата – 0,02 моль/л. В мерную колбу внести соответствующую навеску ПАВ, растворить в некотором количестве очищенной воды при нагревании на водяной бане. После охлаждения раствора объем доводят до метки очищенной водой.

Во избежание образования пены, воду в исходный раствор следует приливать по стенке сосуда и полученный раствор не взбалтывать!

3. Из приготовленного раствора отобрать 100 мл, перенести в другую мерную колбу и довести объем раствора до метки водой очищенной. Так путем последовательного разбавления приготовить семь растворов ПАВ.
4. После приготовления растворов приступить к определению ККМ методом, указанным преподавателем.
5. При использовании метода кондуктометрии измерить удельную электропроводность (κ) воды очищенной и растворов ПАВ с помощью прибора для измерения электропроводности растворов, начиная с самого разбавленного раствора. Для этого ячейку для измерения электропроводности, поместить в термостат. Термостатировать при 25 °С в течение 20 мин и измерить электрическое сопротивление раствора. Затем раствор вылить, ячейку промыть и заполнить раствором более высокой концентрации, термостатировать раствор и снова измерить электрическое сопротивление раствора. Таким образом измерить сопротивление R всех приготовленных растворов. Вычислить величину $1/R=W$, построить график зависимости $W=f(c)$. По точке излома определить значение ККМ.
6. При использовании метода солюбилизации красителя (по указанию преподавателя) в пробирки налить по 5 мл растворов ПАВ с разной концентрацией, приготовленных по п. 2, и в каждую пробирку ввести по 0,5 мл раствора красителя. Проследить визуально (или с помощью фотоэлектроколориметра) изменение окраски растворов. В интервале длин волн 200–800 нм зарегистрировать спектры поглощения растворов, определить значения оптической плотности (A) и длин волн, соответствующих максимуму поглощения. ККМ лежит в интервале значений концентраций тех растворов, где произошло изменение окраски, и определяется как среднее между этими концентрациями. Для уточнения значения ККМ следует приготовить несколько растворов ПАВ промежуточных концентраций и проследить изменение окраски красителя в них.

7. При использовании метода тензиометрии измеряют краевые углы смачивания водой и водными растворами ПАВ пластин тефлона. Перед нанесением на пластину капли раствора ПАВ шприц три раза промывают исследуемым раствором. Измерения начинают с самых разбавленных растворов, последовательно переходя к более концентрированным.

Работа 2. Определение размера частиц в золях турбидиметрическим методом

Цель работы: определение оптической плотности растворов латекса и вычисление размера глобул по уравнению Релея

Оборудование, посуда

фотоэлектроколориметр-нефелометр,
колбы мерные емкостью 100 мл, ?штук,
пипетки на 10 и 1мл

Реактивы:

стабилизатор (1%-ный раствор)
исследуемый латекс,
аммиак (1%-ный водный раствор),
хромовая смесь для мытья посуды.

Введение

Размер частиц можно определять двумя методами: нефелометрическим и турбидиметрическим. По первому методу определяют непосредственно интенсивность света, рассеянного под некоторым углом к падающему лучу света. По второму методу измеряют ослабление интенсивности света при прохождении его через дисперсную систему. Последний метод используется в данной работе. Этот метод основан на том, что при прохождении света через коллоидный раствор, содержащий малые прозрачные частицы, поглощение практически отсутствует и ослабление интенсивности света равно полной интенсивности света, рассеянного коллоидным раствором во всех

направлениях (полное светорассеяние). Для систем, содержащих частицы с размерами, значительно меньше длины световой волны, величина полного светорассеяния подчиняется уравнению Рэлея. В этом случае, измерив с помощью фотометра или колориметра ослабление интенсивности падающего света по уравнению Рэлея можно рассчитать средний размер частиц золя.

Способность системы рассеивать свет и оптическая плотность раствора D связаны следующим образом:

$$D = \lg (I_0/I_{\text{пр}}), \quad (1)$$

где I_0 и $I_{\text{пр}}$ – интенсивности падающего и прошедшего света.

Ослабление интенсивности света в результате рассеяния его слоем коллоидного раствора толщиной l при сечении 1 см^2 определяется следующим образом:

$$\ln (I_0/I_{\text{пр}}) = 2.3 \lg (I_0/I_{\text{пр}}) = \tau l, \quad (2)$$

где τ – коэффициент, характеризующий способность системы рассеивать свет, он называется *мутностью*.

Исходя из уравнений (1) и (2) можно установить связь между мутностью и оптической плотностью:

$$\tau = 2,3D / l \quad (3)$$

Мутность системы можно выразить через интенсивность рассеянного света I_p . Очевидно, что $I_{\text{пр}} = I_0 - I_p$, тогда из уравнения (3) при $l = 1 \text{ см}$ следует:

$$\tau = \ln (I_0/I_{\text{пр}}) = \ln [I_0/(I_0 - I_p)] \quad (4)$$

Учитывая, что $I_p \ll I_0$, и пользуясь разложением в ряд, можно получить:

$$\ln [I_0/(I_0 - I_p)] \approx \ln(1 + I_p/I_0) \approx I_p/I_0 \quad (4)$$

Для суспензии со сферическими частицами уравнение Рэлея можно записать в виде

$$I_p/I_0 = 24 \pi^3/\lambda^4 \cdot [(n_1^2 - n_2^2) / (n_1^2 + 2n_2^2)]^2 \cdot c_{\text{об}} \cdot v, \quad (5)$$

где I_p – полная интенсивность света, рассеянного 1 см³ системы в секунду;
 λ – длина волны света, см; n_1 – показатель преломления дисперсной фазы; n_2 – показатель преломления дисперсионной среды; $c_{об}$ – объемная доля дисперсной фазы; v – объем частицы, см³.

Пользуясь уравнениями (4) и (5), можно рассчитать объем частицы и ее диаметр.

Порядок проведения работы

1. Ознакомиться с инструкцией по работе фотоэлектроколориметром.
2. Из исходного латекса приготовить ряд растворов с разбавлениями 1:10000, 1:5000, 1:3000, 1:2000. Для этого сначала приготовить раствор с разбавлением 1:100, вводя пипеткой 1 мл латекса в колбу, содержащую небольшое количество 1%-го раствора аммиака, и разбавив тем же растворителем до 100 мл. Из полученного раствора приготовить указанные выше (исследуемые) растворы, отбирая пипеткой соответствующие количества исходного раствора в мерные колбы и разбавляя их раствором аммиака до 100 мл.

Пипетки после отбора пробы латекса необходимо тотчас промывать раствором аммиака, также мыть и всю посуду после работы с растворами латекса.

3. Измерить оптическую плотность D приготовленных растворов латекса, используя кюветы длиной 5 см и светофильтр № 5 с $\lambda_{\text{вак}} = 538$ нм.
4. По экспериментальным результатам вычислить средний радиус глобул латекса следующим образом:
 - рассчитать $c_{\text{вес}}$ и $c_{\text{об}}$ для каждого разбавления по известному содержанию сухого остатка (*указывает преподаватель*) и плотности полимера;
 - рассчитать значения τ для всех разбавлений по формуле (2);
 - рассчитать значения $\tau / c_{\text{об}}$.
5. Экспериментальные и расчетные данные внести в табл. 1Л.

Таблица 1Л. Экспериментальные и расчетные данные

Разбавление	D	$c_{\text{вес}}, \text{ г/см}^3$	$c_{\text{об}}, \text{ мл}_{\text{пол}}/\text{мл}_{\text{сист}}$	$\tau, \text{ см}^{-1}$	$\tau/ c_{\text{об}}$
1:10000					
1:5000					
.....					

6. Построить график в координатах $\tau/ c_{\text{об}}$ и $c_{\text{об}}$ и путем экстраполяции найти значение $\tau/ c_{\text{об}}$ при $c_{\text{об}}= 0$.
7. Вычислить значение $k = 24 \pi^3/\lambda^4 \cdot [(n_1^2 - n_2^2) / (n_1^2 + 2n_2^2)]^2$, подставив в выражение $\lambda = \lambda_{\text{вак}} / n_2$.
8. Вычислить объем глобулы v по уравнению (5), подставив в него значение $\tau/ c_{\text{об}}$ при $c_{\text{об}}= 0$.
9. Рассчитать радиус глобул латекса $r = (3v/ 4\pi)^{-3}$.

Таблица 2Л. Свойства некоторых веществ

Вещество	Плотность, г/см^3	Показатель преломления
Полистирол	1,06	1,593
СКС=30	0,93	1,545
СКС=50	0,99	1,558
Полихлоропрен	1,23	1,558
Вода	1,00	1,333

Работа 3. Получение липосом, нагруженных инсулином

Цель работы: получить липосомы, нагруженные инсулином, двумя методами, оценить влияние способа получения на размеры липосом.

Оборудование, посуда:

аппарат УЗДН-2Г,
 ультразвуковая ванна;
 роторный испаритель,
 медицинский шприц на 20 мл,
 колбы для роторного испарителя на 100 и 200 мл,
 колбы мерные емкостью 200 мл, 7 штук,
 промывалка,

штатив с пробирками,
химический стакан объемом 50 мл.

Реактивы:

инсулин,
вода очищенная,
0,01 М фосфатный буфер (рН 7),
1%-ный водный раствор уранилацетата,
хромовая смесь дихромата калия (15 г) и концентрированной
серной кислоты (500 мл).

От преподавателя студент получает указание, какими методами (методом обращения фаз, инъекционным методом, методом ручного встряхивания, методом ультразвукового диспергирования) получать липосомы.

Введение

Липосомы – это микроскопические сферические частицы, оболочка (мембрана) которых состоит из молекул липидов, чаще всего – фосфолипидов. Как известно, липиды – гидрофобные соединения, т.е. отталкивающие от себя молекулы воды; они являются одним из основных компонентов биологических клеточных мембран, создающих в организме энергетический резерв, а также способных образовывать защитные покровы.

Водорастворимые (гидрофильные) лекарственные средства могут быть заключены во внутреннее водное пространство липосом, а жирорастворимые (гидрофобные) включаются в бислойную липидную мембрану. В последнее время липосомы находят все большее признание в мире, как перспективные носители лекарственных средств, поскольку многочисленные клинические испытания показали, что последние в составе липосом более эффективны и менее токсичны, чем вводимые в свободном виде.

Достоинства липосом как носителей лекарственных средств очевидны: полученные из природных фосфолипидов липосомы, в отличие

от полимерных систем доставки полностью биodeградируемы и биосовместимы, пригодны для включения в них многих фармакологических агентов, в том числе ферментов, гормонов, витаминов, антибиотиков, иммуномодуляторов, цитостатиков. Включенные в липосомы лекарственные средства становятся более устойчивыми в организме, так как изолированы липидной мембраной от повреждающих воздействий внешних условий, в частности, от разрушения в желудочно-кишечном тракте, и в свою очередь в меньшей степени оказывают общетоксическое действие на организм. Уникальной особенностью липосом является возможность доставки лекарственных средств внутрь клеток, с которыми они взаимодействуют путем слияния или эндоцитоза. Модифицируя мембрану липосом молекулами, обеспечивающими «узнавание» клетки или органа-мишени, можно осуществлять направленную транспортировку лекарственных средств.

Порядок выполнения работы

Приготовление липосом методом обращения фаз

1. Лецитин в количестве 30 мг растворить в 3 мл смеси эфира с хлороформом (в соотношении 2:1) и внести полученный раствор в круглодонную колбу роторного испарителя объемом 100 мл.
2. Включаемый материал – инсулин (в 0,01 М фосфатном буфере pH 7,5) добавить в объеме 1 мл к раствору фосфолипидов в органической фазе и обработать ультразвуком частотой 22 кГц и мощностью 500 Вт (аппарат УЗДН-2Т) в течение 30 секунд дважды.
3. Колбу с образовывавшейся эмульсией типа «вода в масле» присоединить к роторному испарителю и при вращении колбы постепенно понижать давление так, чтобы не происходило кипения органического растворителя. Растворитель полностью удалить. Об окончании выпаривания судят по образованию геля в колбе и исчезновению запаха органического растворителя.

4. Колбу снять с испарителя, к образовавшемуся гелю добавить 5 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,5) и встряхивать до образования гомогенной структуры суспензии.

(Данный метод позволяет иммобилизовать в липосомах до 78% действующего вещества).

Приготовление липосом инъекционным методом

1. Лецитин в количестве 50 мг растворить в 1,0 мл 96 %-го этанола.
2. Полученный раствор набрать в шприц с иглой 0,4 x 30,0 мм и быстро ввести в 15 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,5), в котором предварительно растворить включаемый инсулин. Образование липосом происходит при температуре водной фазы выше температуры фазового перехода фосфолипидов (для яичного лецитина – при комнатной температуре) с постоянным перемешиванием на магнитной мешалке. При этом игла шприца должна быть максимально погружена в водную фазу.

Приготовление липосом методом ручного встряхивания

1. Лецитин в количестве 100 мг растворить в 50 мл хлороформа в круглодонной колбе (на 200 мл) роторного испарителя.
2. Колбу присоединить к роторному испарителю и при пониженном давлении, создаваемом вакуумным насосом, провести выпаривание органического растворителя. При этом давление регулировать таким образом, чтобы не происходило его кипения.
3. После полного удаления органического растворителя на стенках колбы должна образоваться тонкая пленка липидов. В колбу с пленкой добавить 5 мл буферного раствора, содержащего инсулин, и выдержать 1-2 часа при комнатной температуре для набухания пленки фосфолипидов.
4. Далее колбу встряхивать в течение нескольких минут механическим способом. Для этого в нее внести стеклянные бусинки и интенсивно перемешивать содержимое колбы скоростной мешалкой. При этом образуется густая взвесь липосом молочно-белого цвета.

Приготовление липосом методом ультразвуковой обработки

1. Лецитин в количестве 100 мг растворить в 50 мл хлороформа в круглодонной колбе (на 200 мл) роторного испарителя.
2. Колбу присоединить к роторному испарителю и при пониженном давлении, создаваемом вакуумным насосом, провести выпаривание органического растворителя. При этом давление регулировать таким образом, чтобы не происходило его кипения.
3. После полного удаления органического растворителя на стенках колбы должна образоваться тонкая пленка липидов. В колбу с пленкой добавить 5 мл буферного раствора, содержащего инсулин, и выдержать 1-2 часа при комнатной температуре для набухания пленки фосфолипидов.
4. Далее колбу поместить в ультразвуковую ванну и подвергнуть ультразвуковой обработке в течение времени, указанного преподавателем. Можно проводить ультразвуковую обработку с помощью дезинтегратора УЗДН-2Т. При этом образуется густая взвесь липосом молочно-белого цвета.

Оценку полученных липосом проводят органолептически, измеряют pH среды, с помощью микроскопа определяют наличие конгломератов липосом.

Органолептическая оценка качества липосом заключается в определении их цвета, проверке на отсутствие запаха эфира и хлороформа, что свидетельствует о качестве отгонки растворителя на определенной стадии производства липосом.

Для визуальной оценки свежеприготовленное «липосомальное молочко» отбирают в пробирку в количестве 8-10 мл, оставляют при комнатной температуре на 50 мин, по истечении времени наблюдают расслоение эмульсии, что говорит о наличии липосом. Далее проверяют наличие конгломератов во взвеси липосом; их отсутствие свидетельствует о хорошем качестве изготовленных липосом.

Анализ размера липосом проводят следующим образом.

1. Взвесь липосом с помощью бактериологической петли нанести на сетку-подложку, покрытую вольфрамовой пленкой. Избыток материала удалить фильтровальной бумагой.
2. Препарат липосом на сетке контрастировать 1%-ным водным раствором уранилацетата, который также нанести бактериологической петлей. Материал исследовать на электронном микроскопе при инструментальном увеличении в 50000-80000 раз.
3. Размеры липосом измерить турбидиметрическим методом (см. *Лабораторную работу №2*) или оценить размер на микрофотографиях просвечивающего или сканирующего электронного микроскопа.
4. Исходя из полученных данных, липосомы группировать по размеру (очень мелкие, мелкие, средние, крупные и очень крупные).

Средний диаметр липосом в препарате рассчитать по формуле:

$$D = [\sum n D_v^{-3} / \sum n]^{(1/3)K-1}$$

Где: D – средний диаметр липосом в препарате, мкм;
 D_v – средний диаметр липосом в каждой группе, мкм;
 n – число липосом в каждой группе;
 K – коэффициент увеличения, включая инструментальное увеличение и увеличение микрофотографий.

Работа 4. Синтез золь наночастиц серебра

Цель работы: синтез водного золь наночастиц серебра, стабилизированных цетилтриметиламмония бромида (ЦТМАБ)

Оборудование: оптический спектрофотометр «Jenway 6310» или др. модели;
 спектрофлуориметр «Флюорат-02-Панорама» или др. модели;
 кварцевые кюветы с двумя и четырьмя прозрачными стенками с длиной оптического пути 1 см;
 ультразвуковая ванна;
 регулируемые пипет-дозаторы объемом 10, 200, 1000 мкл;
 химический стакан объемом 50 мл.

Реактивы: серебра нитрат AgNO_3 , цетилтриметиламмония бромид $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{C}_{16}\text{H}_{33}]\text{Br}^-$ (ЦТМАБ), натрия боргидрид NaBH_4 , вода очищенная.

Введение

Взаимодействие внешнего электромагнитного поля с проводящими объектами, такими как наночастицы серебра, имеет свою особенность, сказывающуюся на их оптических свойствах.

При попадании проводящего объекта размером, существенно меньшим длины волны внешнего электромагнитного излучения, в силу высокой подвижности электронов в нем происходит поляризация и связанное с ней перераспределение поверхностного заряда. Это явление в оптике получило название *поверхностный плазмонный резонанс*. Резонансная частота, при которой это происходит, соответствует максимуму поглощения в оптических спектрах пропускания золей наночастиц металлов (рис. 2Л).

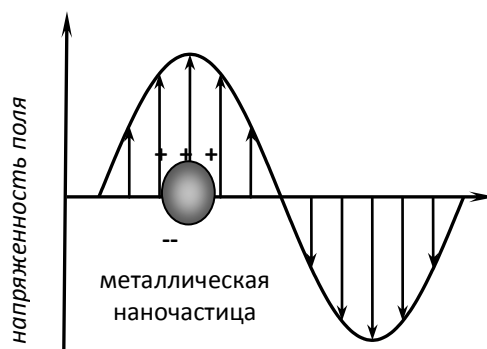


Рис. 2Л. Возникновение эффекта поверхностного плазмонного резонанса при взаимодействии внешнего электромагнитного поля с металлическими наночастицами

Для благородных металлов максимальное поглощение поверхностного плазмонного резонанса находится в области УФ – видимого излучения. Так, пик плазмонного резонанса для платины лежит около 270, для серебра – около 400 (рис. е), для золота – около 530 нм.

Наличие пика поверхностного плазмонного резонанса является качественным критерием наличия в системе металлических наночастиц.

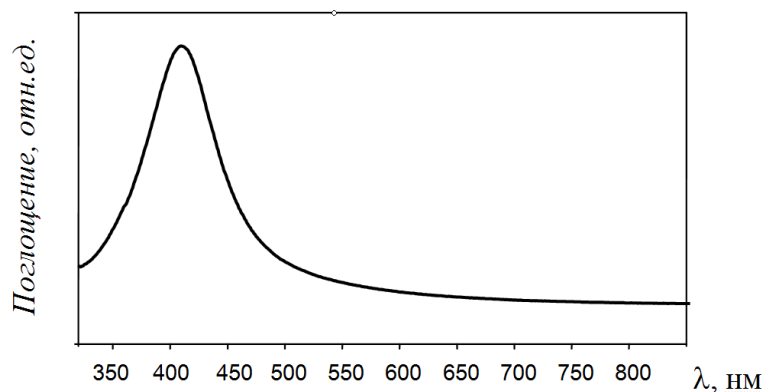


Рис. 3Л. Спектр поглощения сферических наночастиц серебра

Спектр поглощения получают, регистрируя интенсивность излучения, прошедшего сквозь образец при изменении длины волны монохроматического излучения, выделенного с помощью монохроматора (рис. 4Л).

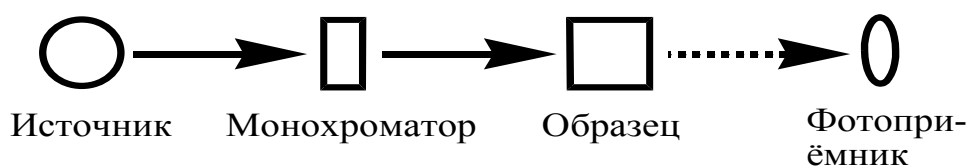


Рис. 4Л. Оптическая схема регистрации поглощения излучения однолучевым прибором

При использовании однолучевого прибора необходимо проводить две съемки спектров поглощения – сначала образца сравнения (построение и запоминание нулевой линии), затем – анализируемого образца.

Из-за избыточной энергии, связанной с высокой долей поверхностных атомов, металлические наночастицы термодинамически неустойчивы и стремятся к коагуляции. Это обстоятельство объясняет то, что, как правило, с использованием механического измельчения не удастся получить наноразмерное состояние для металлов. Поэтому основным методом их получения является химический синтез.

Обычно в реакцию вводят три компонента: соединение металла, восстановитель и стабилизатор. Роль последнего состоит во взаимодействии с получаемой *in situ* наночастицей, понижении ее поверхностной энергии и, достигаемой таким образом, стабилизации системы. Одним из видов стабилизаторов для серебра являются поверхностно-активные соединения, например, ЦТМАБ.

Порядок выполнения работы

1. Взвесить на аналитических весах три навески реагентов: 34,0 мг (0,2 ммоль) AgNO_3 ; 91,1 мг (0,25 ммоль) ЦТМАБ; 14,4 мг (0,2 ммоль) NaBH_4 .
2. Навеску NaBH_4 непосредственно перед синтезом растворить в 1 мл воды очищенной.
3. Отмерить 4 мл воды в химический стакан объемом 50 мл и установить его в ультразвуковую ванну таким образом, чтобы вся жидкость находилась ниже уровня воды в ванне.
4. Установить время ультразвуковой обработки 10 мин и включить источник ультразвука.
5. Затем последовательно ввести в стакан навески ЦТМАБ и AgNO_3 .
6. По окончании растворения реагентов снова включить источник ультразвуковой ванны на 10 минут и в полученную смесь порциями по 10 мкл ввести раствор NaBH_4 .
7. После окончания введения NaBH_4 продолжить ультразвуковую обработку полученного золя наночастиц серебра в течение 20 минут. В результате получается 5 мл золя с концентрацией серебра 50 ммоль/л.
8. По окончании синтеза с использованием оптического спектрометра записать спектр поглощения наночастиц серебра.