

На правах рукописи

**Стрекалова Оксана Сергеевна**

**ФОСФОЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ: ПОЛУЧЕНИЕ, ХАРАКТЕРИСТИКА,  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДЛЯ ТРАНСПОРТА ЛЕКАРСТВ В ОРГАНИЗМЕ.**

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно – исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН

**Научный руководитель:** Доктор биологических наук  
Ипатова Ольга Михайловна

**Официальные оппоненты:** Академик РАМН, профессор,  
Швец Виталий Иванович  
  
Доктор биологических наук  
Шумянцева Виктория Васильевна

**Ведущая организация:** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «25» ноября 2010 г. в 11 часов в Конференц-зале на заседании диссертационного совета Д 001.010.01 при ИБМХ РАМН по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН по адресу: 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» октября 2010 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Д 001.010.01, к.х.н.

Карпова Е.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы.

Развитие науки и технологий в настоящее время наряду с поиском и синтезом новых лекарственных соединений позволяет совершенствовать уже используемые средства и производить новые оригинальные препараты, отличающиеся высокой эффективностью, биодоступностью, отсутствием или снижением побочного действия. Одним из таких подходов является конструирование систем пассивного и/или направленного транспорта лекарств к пораженным органам и клеткам-мишеням.

Лекарства, снабженные системой доставки, имеют ряд преимуществ по сравнению со свободными препаратами: а) повышается растворимость гидрофобных лекарств; б) улучшается проникновение в клетки; в) улучшается фармакокинетика, г) появляется способность пересекать мембранные и гематоэнцефалический барьеры (Ishii F. et al., 2005). В настоящее время около 25% мирового объема продаж лекарственных средств составляют препараты, снабженные системами транспорта/доставки.

В качестве транспортных систем применяют наночастицы разной природы: полимерные, на основе природных материалов, металлов и т.д. Большой интерес представляют системы транспорта/доставки на основе фосфолипидов, т.к. они биodeградируемы, не вызывают аллергических реакций, поверхность наночастиц на их основе легко модифицируется для придания тех или иных свойств. Среди фосфолипидных систем транспорта/доставки наиболее известными являются липосомы. Открытые Бенгамом в начале 1960-х годов (Bangham A.D., 1964), они первыми были использованы для транспорта лекарств и до настоящего времени наиболее широко представлены на фармацевтическом рынке (Швец В.И., 2008; Sofou S., 2007).

Липосомы способны защитить инкапсулированные лекарства от преждевременной деградации; увеличить время циркуляции и обеспечить прохождение естественных барьеров (мембраны клеток, гематоэнцефалический и др. барьеры).

К основным недостаткам липосомальных систем транспорта можно отнести: (1) быструю деградацию в кровяном русле, (2) относительно крупный диаметр частиц (200-400 нм), (3) доступность для лизиса ретикулоэндотелиальной системой клетки, (4) малое количество транспортируемого соединения, ограниченное «внутренним» объемом липосомы. Существуют определенные подходы в преодолении этих недостатков. Например, стерическая стабилизация липосом (покрытие полиэтиленгликолем), что с одной стороны, способствует увеличению времени циркуляции частиц в кровотоке, но с другой – осложняет высвобождение лекарства и способствует проявлению аллергических реакций при применении таких лекарственных форм (Pérez-López M.E. et al., 2007). Другим, более эффективным подходом, является снижение размера фосфолипидных частиц. Так, показано, что уменьшение диаметра фосфолипидных липосом в 8 раз приводит к увеличению их времени циркуляции в кровотоке в 40 раз (Drummond D., 1998).

Возможность получения частиц предельно малого размера (менее 100 нм) позволит (1) предохранить их от «захвата» РЭС, (2) увеличить стабильность и время циркуляции в крови и (3) обеспечить доставку лекарства внутрь клетки. Было показано, что чем меньше размер фосфолипидных наночастиц, тем более выражен их оптимизирующий эффект на фармакокинетику лекарства и эффективность его проникновения в органы и ткани (Deepak Thassu et al., 2007).

Необходимо отметить, что снижение размера фосфолипидных наночастиц позволит за счет изменения поверхностных свойств существенно увеличить количество транспортируемого лекарства, которое, в случае липосом жестко ограничено их внутренним «объемом» (Дранов А.Л., 1996; Краснопольский Ю.М., 1998).

Таким образом, разработка технологии получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера и системы транспорта на их основе для повышения биодоступности и терапевтической эффективности лекарств является актуальной задачей.

**Цель работы:** Получить фосфолипидные наночастицы предельно малого размера, изучить их физико-химические свойства и эффективность как системы транспорта для лекарств.

**Задачи исследования:**

1. Изучить влияние технологических параметров гомогенизации под высоким давлением (температура процесса, количество циклов, давление, концентрация фосфолипида) на размер получаемых фосфолипидных наночастиц.
2. Оптимизировать технологию получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера.
3. Изучить физико-химические свойства полученных фосфолипидных наночастиц.
4. Изучить влияние на фармакокинетику включения лекарственных соединений в фосфолипидные наночастицы предельно малого размера.

**Научная новизна**

В ходе выполнения данной работы впервые получены фосфолипидные наночастицы предельно малого размера (до 30 нм) без использования детергентов и стабилизаторов. Определены их основные физико-химические характеристики. Впервые показано влияние включения лекарственного соединения в фосфолипидные наночастицы размером до 30 нм на его фармакокинетику. Показана возможность неселективного транспорта лекарств в организме с помощью фосфолипидных наночастиц. Разработанная технология включения лекарственных соединений различных терапевтических групп в фосфолипидные наночастицы позволит получать лекарства нового поколения – нанолекства. По результатам выполненной работы подана одна заявка на изобретение и получено два патента.

**Практическая значимость.**

1. Лабораторная технология получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера масштабирована в условиях опытно-промышленного производства.

2. Оптимизированы основные этапы технологического процесса.
3. Разработанная технология легла в основу проекта одобренного ГК «Роснано» «Организация производства нанолечарств на основе фосфолипидной транспортной системы».

#### **Апробация работы.**

Основные положения диссертационной работы были доложены на V Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», (Москва, Россия, 2009); VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность» (Москва, Россия, 2009); The 4th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine” (N.Novgorod, Russia, 2008); The 5th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine” (St. Petersburg, Russia, 2010).

#### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 1 статья - в ведущем рецензируемом научном журнале определенном ВАК, 4 публикации - в сборниках докладов научных конференций, 1 заявка на изобретение и 2 патента РФ.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 145 источников. Работа изложена на 115 страницах текста, содержит 28 рисунков и 15 таблиц.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**1.1. Материалы.** В работе использовали соевый фосфатидилхолин Lipoid S 100 (Lipoid, Германия), мальтозы моногидрат (MERCK, Германия), вода для инъекций (по ФС №42-4587-95), лекарственные субстанции: доксорубин, арбидол, будесонид (ЛонгШенгЛтд, Китай). Хлорин Е6 был получен в лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ РАМН д.б.н. Пономаревым Г.В., преднизолон – получен биотехнологическим путем в Центре «Биоинженерии» РАН.

**1.2. Получение фосфолипидных наночастиц.** Lipoid S 100 (25г) суспендировали в водном растворе мальтозы (500 мл) для получения первичной (грубой) эмульсии. Грубую эмульсию заливали в приемную емкость целевого гомогенизатора высокого давления Mini-Lab 7.30 VH, Rannie, Дания (APV-гомогенизатор) (способ А) или на приборе M110EH30K, Microfluidics, США (микрофлюидайзер) (способ Б) и гомогенизировали в циклическом режиме. После каждого цикла осуществляли отбор проб для контрольных измерений.

#### **1.3. Изучение физико-химических свойств фосфолипидных наночастиц.**

**Определение светопропускания** проводили на спектрофотометре Agilent 8453 ("Agilent Technologies", Германия) с использованием программы HP UV Visible ChemStation при длине волны 660 нм.

**Размер фосфолипидных наночастиц** определяли методом лазерного корреляционного светорассеяния на приборе "Beckman N5 Submicron Particle Size Analyzer" ("Beckman Coulter, Inc.", США), оснащенного гелий-неоновым лазером с длиной волны  $\lambda=632,8$  нм и мощностью 25 мВт при угле рассеяния  $90^\circ$  с использованием программного обеспечения PCS Control Software Version 3.02.

**Измерения размера частиц фосфолипидной наноэмульсии методом атомносиловой микроскопии** проводили в лаборатории нанобиотехнологии ИБМХ РАН на приборе NTEGRA (NT-MDT, Россия), материал подложки слюда, графит (HOPG), слюда, модифицированная раствором  $MgCl_2$ .

**Измерение размера фосфолипидных наночастиц методом электронной микроскопии** проводили в лаборатории электронной микроскопии ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН. Образцы для электронных микрофотографий получали негативным контрастированием 1% водным раствором уранилацетата. Микрофотографии получали с помощью электронного микроскопа Joel 100CX (Япония) при инструментальном увеличении 20000 или 50000.

**Стабильность фосфолипидных наноэмульсий** изучали в соответствии с «Временной инструкцией по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств», 1984, а также в условиях хранения при температуре  $25^\circ$  и  $4^\circ C$ . Качество препарата в процессе хранения оценивали по изменению светопропускания и размера фосфолипидных наночастиц в образцах.

**Измерение дзета потенциала** проводили на приборе Delsa nano ("Beckman Coulter, Inc.", США) методом электрофоретического рассеяния под углом  $30^\circ$  по изменению распределения частиц в электрическом поле.

**Определение процента включения** лекарственных субстанций в фосфолипидные наночастицы проводили с использованием метода ультрафильтрации (Tsukioka, 2002) с помощью фильтра (Ultrafree-MC Filters NMWL 10000 Da). Количественный анализ содержания лекарственных субстанций после ультрафильтрации проводили методом ВЭЖХ. Условия хроматографии подбирали для каждого конкретного лекарственного соединения.

#### **1.4. Изучение фармакокинетических параметров лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц**

**Биодоступность лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц** изучали в экспериментах на животных (крысы породы Wistar весом 300-400 г), содержащихся в стандартных условиях и на стандартной диете. За 16 часов перед началом эксперимента у животных убирали корм, оставляя достаточное количество питья. Лекарственные препараты вводили перорально и внутривенно, забор крови осуществляли через определенные промежутки времени из хвостовой вены.

**Предподготовка образцов крови для количественного определения исследуемой субстанции.** Образцы крови для получения плазмы/сыворотки центрифугировали 10 мин. при 3000g. Для экстракции лекарственных субстанций к сыворотке/плазме добавляли 9-

кратный объем метанола и инкубировали 4-6 минуты при постоянном перемешивании. Затем центрифугировали 10 мин. при 10000g для осаждения белков. В надосадочной жидкости с помощью ВЭЖХ количественно определяли наличие лекарственной субстанции.

*Распределение лекарственного соединения по компонентами плазмы* изучали методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности после инкубации образцов с плазмой крови человека. Центрифугирование проводили на ультрацентрифуге L8-M (Beckman Instrument, Inc., США). Фракции на наличие лекарственной субстанции анализировали с помощью ВЭЖХ или масс-спектрометрии.

*Специфическую активность лекарственных композиций* на основе фосфолипидных наночастиц изучали на соответствующих моделях заболеваний экспериментальных животных.

*Фотоиндуцированную противоопухолевую активность лекарственной композиции на основе фосфолипидных наночастиц и хлорина Е6 (НФ-Хлорин Е6)* изучали в сравнении с препаратом "Радахлорин" (ООО "РАДА-ФАРМ", Россия) на животных с привитой опухолью - карциномой легкого Льюиса (LLC).

*Противовирусная активность лекарственной композиции на основе фосфолипидных наночастиц и арбидола (Арболип)* была исследована в сравнении со свободной лекарственной субстанцией арбидола на модели гриппозной пневмонии мышей.

*Противовоспалительное действие лекарственной композиции на основе фосфолипидных наночастиц и преднизолона (НФ-преднизолон)* исследовали в сравнении со свободной лекарственной субстанцией преднизолона на мышах-самцах линии СВА на модели конквалинового отека.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### **2.1. Разработка метода получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера**

В настоящее время можно выделить три основных способа получения фосфолипидных частиц (мицелл/липосом): (1) обработка грубой эмульсии фосфолипидов в воде ультразвуком; (2) экструзия грубой эмульсии фосфолипидов в воде; (3) гомогенизация под высоким давлением.

Метод звуковой дезинтеграции не получил широкого распространения, так как обладает рядом недостатков, из которых наиболее важными являются: (1) сильный неконтролируемый разогрев рабочего раствора, (2) большая площадь соприкосновения с кислородом воздуха и неконтролируемое окисление фосфолипидов, (3) загрязнение рабочего раствора частицами титана (озвучивающий наконечник). Применение ультразвука также ограничивает необходимость использования энергозатратных мощных установок.

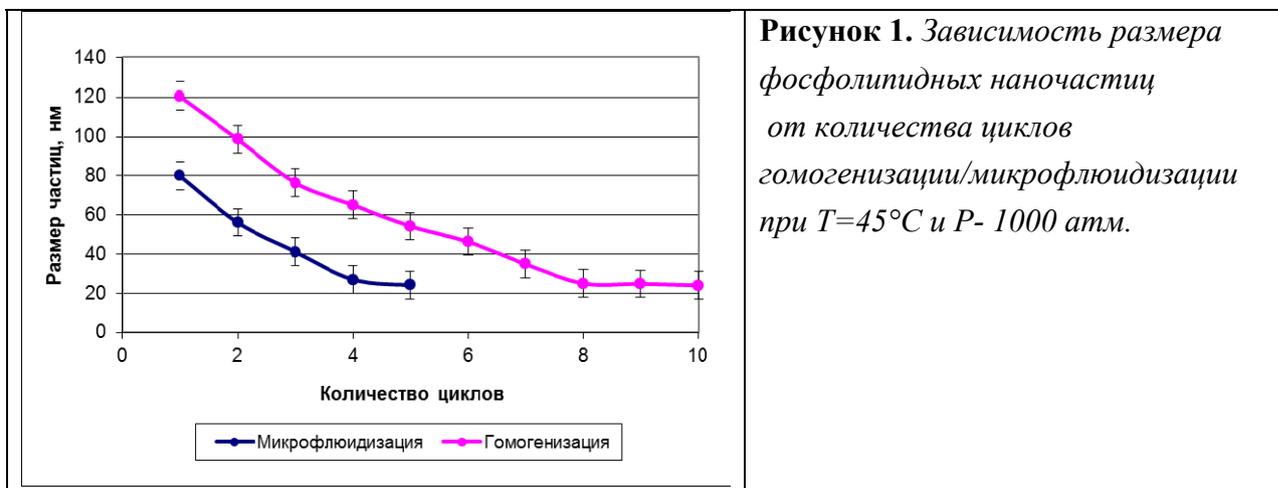
Для получения тонкодисперсных фосфолипидных эмульсий используют также метод выдавливания вещества дисперсной фазы через тонкие отверстия в дисперсионную среду под высоким давлением (метод экструзии). Диспергирование проводят многократно, продавливая эмульсию через мембраны с соответствующим размером пор. Метод имеет свои ограничения для применения в промышленных условиях.

Наибольшее распространение получил метод гомогенизации под высоким давлением, который можно подразделить на (1) щелевую гомогенизацию и (2) микрофлюидизацию (продавливание водно-липидной эмульсии через каналы или капилляры определенного размера и конфигурации).

ИБМХ РАМН много лет занимается разработкой лекарственных препаратов на основе растительных фосфолипидов, в частности, фосфолипидов сои. В Институте был разработан и внедрен в медицинскую практику препарат Фосфоглив, инъекционная форма которого представляет собой эмульсию фосфолипидных наночастиц, размером 40-50 нм, стабилизированных солью глицирризиновой кислоты. Одним из технологических этапов получения инъекционной формы Фосфоглива является щелевая гомогенизация (RU 2304430 С2, 2005). Учитывая имеющийся в ИБМХ РАМН опыт работы с фосфолипидами, а также данные литературы, для получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера в настоящей работе был выбран метод гомогенизации под высоким давлением. В работе проведено сравнение возможности получения фосфолипидных наночастиц с помощью APV-гомогенизатора и микрофлюидайзера. Использование такого оборудования позволит вести процесс в асептических условиях, при постоянном контроле температуры и давления (A. Thompson, 2006, S. Jafari, 2006, S. Kwon, 2002).

### 2.1.1. Выбор условий получения фосфолипидной наноэмульсии с предельно малым размером частиц

*Влияние количества циклов гомогенизации/микрофлюидизации* на размер фосфолипидных наночастиц. Для выбора прибора (микрофлюидайзера или гомогенизатора) на начальном этапе, используя давление 1000 атм. и  $T=45^{\circ}\text{C}$  нами была проведена серия экспериментов по определению влияния количества циклов гомогенизации на размер получаемых наночастиц (Рис. 1).



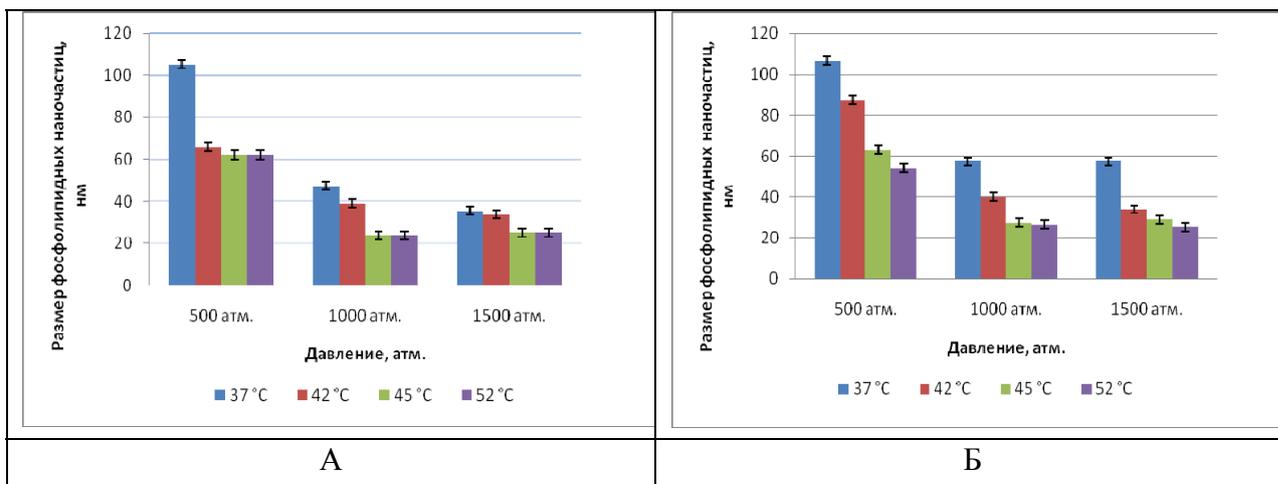
**Рисунок 1.** Зависимость размера фосфолипидных наночастиц от количества циклов гомогенизации/микрофлюидизации при  $T=45^{\circ}\text{C}$  и  $P=1000$  атм.

Из данных, представленных на рисунке 1 видно, что при гомогенизации фосфолипидов с помощью микрофлюидайзера уже после 4-5 циклов образуется наноэмульсия с наименьшим размером фосфолипидных частиц (20-30 нм). Аналогичные результаты были получены с использованием APV-гомогенизатора, но для этого потребовалось 7-8 циклов гомогенизации.

Важно также отметить, что наноэмульсия, полученная на микрофлюидайзере (5 циклов), была более гомогенной: величина индекса полидисперсности -  $I.P. = 0,554$ . против  $I.P. = 0,646$  образцов, полученных на APV-гомогенизаторе (8 циклов). Полидисперсный анализ подтверждает этот вывод, т.к. в эмульсии, полученной на микрофлюидайзере процент частиц с диаметром  $(23 \pm 4)$  нм составил 94%, после гомогенизации на APV-гомогенизаторе лишь 88% частиц имели диаметр  $(25 \pm 6)$  нм.

Таким образом, приведенные данные показывают, что для получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера достаточно 5 циклов микрофлюидизации и 8 циклов при использовании щелевого гомогенизатора.

**Влияние температуры и давления гомогенизации/микрофлюидизации** на размер фосфолипидных наночастиц. На следующем этапе было изучено влияние температуры и давления на размер фосфолипидных наночастиц (Рис.2). При этом для получения наноэмульсий были использованы данные, полученные на первом этапе (5 циклов микрофлюидизации и 8 - щелевой гомогенизации).



**Рисунок 2.** Зависимость диаметра фосфолипидных наночастиц от давления и температуры: А - микрофлюидайзер; Б – гомогенизатор высокого давления.

Из рис.2 видно, что при давлении 500 атм. и  $T = 37^\circ\text{C}$  размер частиц, полученных как на микрофлюидайзере, так и на APV-гомогенизаторе превышал 100 нм. Повышение температуры процесса приводило к уменьшению размера фосфолипидных частиц до 60 нм. Наименьший размер фосфолипидных наночастиц (менее 30 нм) был получен при температуре процесса  $45^\circ\text{C}$  и давлении 1000 атм, как способом А, так и способом Б. Дальнейшее повышение давления до 1500 атм. не приводило к существенному уменьшению размера и сопровождалось окислением фосфолипидов как в случае APV-гомогенизатора, так и при использовании микрофлюидайзера.

Таким образом, оптимальными параметрами для получения фосфолипидной эмульсии с предельно малым размером наночастиц являются: количество циклов 8 при использовании гомогенизатора и 5 при использовании микрофлюидайзера,  $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 1000\text{ атм}$ . Необходимо отметить, что применение микрофлюидайзера позволяет проводить процесс с меньшими энергозатратами, с более точным и удобным контролем технологических параметров.

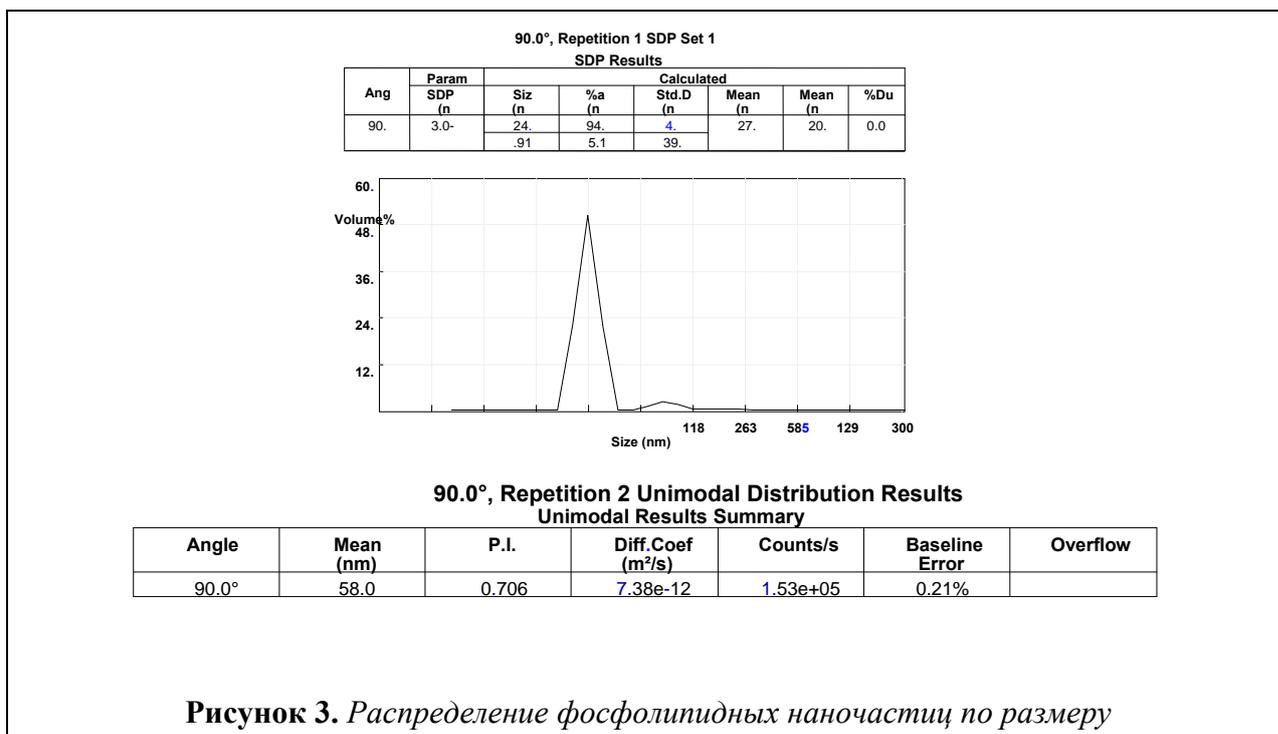
Получение фосфолипидных наночастиц предельно малого размера состоит из четырех этапов: (1) приготовление первичной (грубой) эмульсии; (2) получение наноэмульсии; (3) стерилизующая фильтрация и (4) лиофильное высушивание. Способ получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера был масштабирован в условиях опытно-промышленного производства ИБМХ РАМН.

## **2.2. Изучение физико-химических свойств фосфолипидных наночастиц**

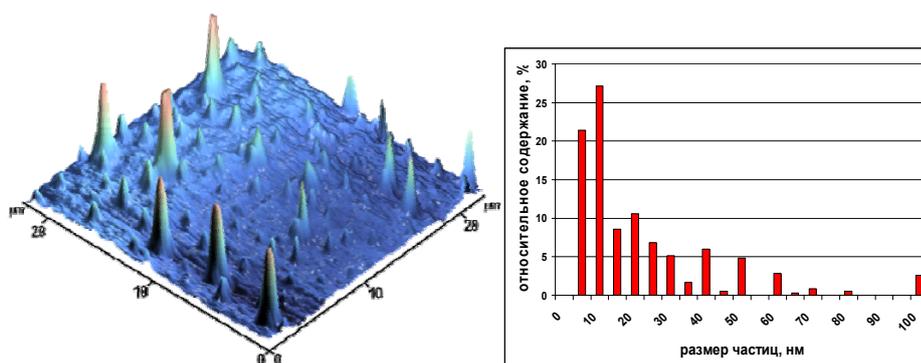
Для изучения физико-химических свойств были использованы образцы фосфолипидной наноэмульсии полученные после 5 циклов микрофлюидизации при  $T = 45^{\circ}\text{C}$  и  $P = 1000\text{ атм}$ .

**Светопропускание (прозрачность) фосфолипидной наноэмульсии** согласно Государственной Фармакопее XI является одним из параметров, характеризующих жидкие лекарственные формы, и должно быть не менее 60%. Для фосфолипидной наноэмульсии с размером частиц до 30 нм, полученной согласно приведенным выше условиям, светопропускание при 660 нм было выше 65%. В серии экспериментов ( $n = 10$ ) было показано, что светопропускание фосфолипидной эмульсии при концентрации ФХ 25 мг/мл составляло  $(80 \pm 3)\%$ . При этом более 85% частиц имели средний диаметр  $(20 \pm 2)$  нм. Таким образом, измерение светопропускания фосфолипидной эмульсии может быть использовано в качестве экспресс-метода контроля процесса гомогенизации и определения момента его окончания.

**Размер фосфолипидных наночастиц** определяли методами лазерно-корреляционной спектроскопии и атомно-силовой микроскопии (Рис.3, 4).



**Рисунок 3.** *Распределение фосфолипидных наночастиц по размеру*



Б

**Рисунок 4.** *Визуализированное с помощью АСМ изображение частиц и распределение по размерам фосфолипидные наночастицы*

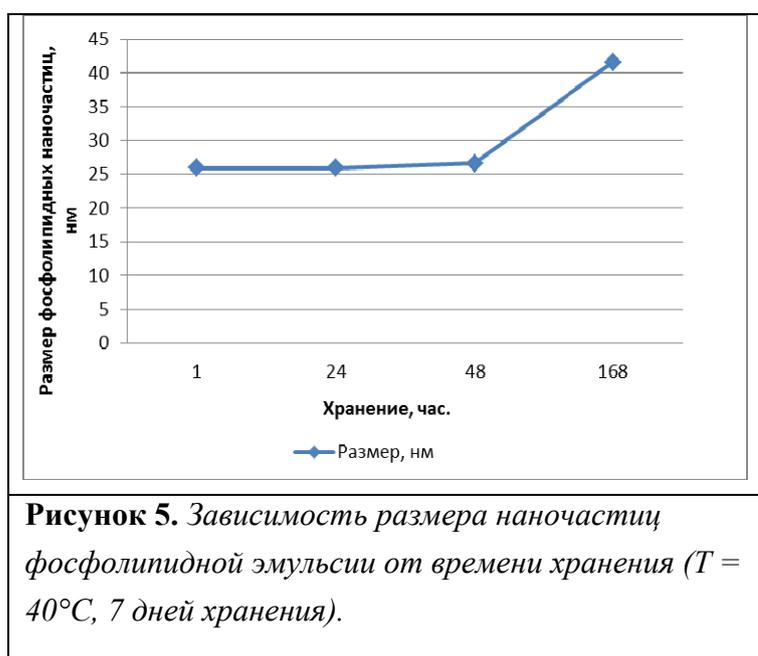
Как видно из представленных на рисунках 3 – 4 данных, средний диаметр фосфолипидных наночастиц, определенный вышеперечисленными методами, совпадает и составляет в среднем  $20 \pm 3$  нм.

**Стабильность фосфолипидных наночастиц** была определена методами длительного и ускоренного хранения (табл.1, рис.5.).

Таблица 1.

**Изменение размера фосфолипидных наночастиц при длительном хранении  
(120 дней при T= 4°C)**

Срок хранения	Диаметр частиц, нм n=3
0	21 ± 2
30 суток	24 ± 3
37 суток	22 ± 2
3 месяца	23 ± 2
4 месяца	23 ± 3



Из данных, представленных в таблице 1 и рисунке 6 видно, что наночастицы, получаемые по разработанному методу, достаточно стабильны как в условиях длительного, так и ускоренного хранения. Размер наночастиц практически не изменялся при хранении в течение 4-х месяцев и T = 4 °C (таблица 1). Некоторое увеличение размера (от 20 до 40 нм) наблюдалось через 7

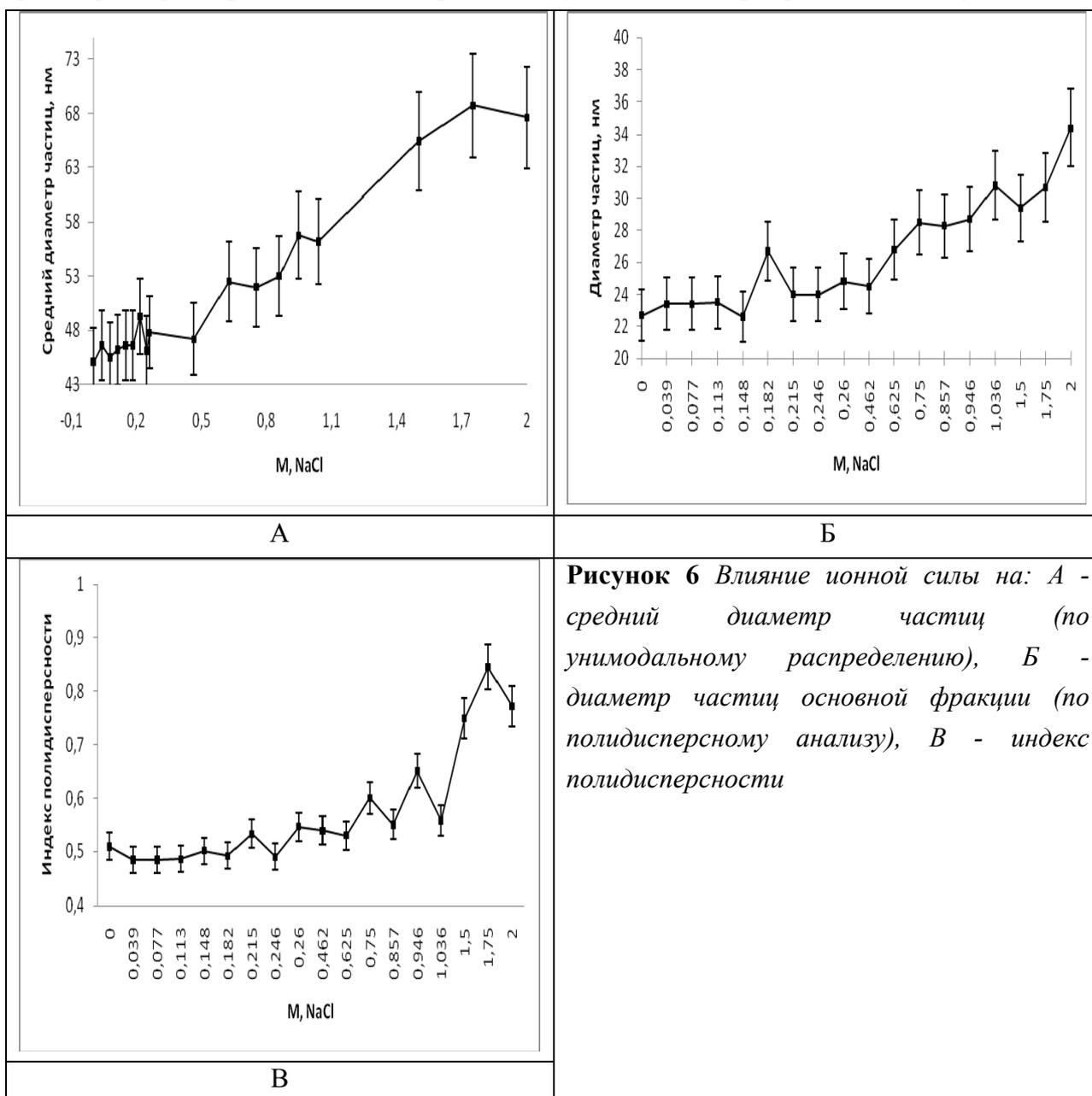
дней ускоренного хранения при 40°C, что соответствует 20 месяцам хранения при температуре 20-25°C (рис.5).

***Влияние ионной силы на стабильность фосфолипидных наночастиц***

Известно, что проницаемость липидного бислоя варьируется в широком интервале: от  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  для молекул воды до  $10^{-(11+14)}$  см/сек. для таких ионов как Cl<sup>-</sup> и Na<sup>+</sup> (Needham 1996). Определяющим фактором, контролирующим проницаемость мембраны является ее упорядоченность: более упорядоченные обладают меньшей проницаемостью (De Giewt 1968). При изменении состава внешнего окружения наблюдается тенденция к выравниванию химических потенциалов в объёме - возникает диффузионный перенос вещества. Этот процесс характеризуется термодинамическим параметром – осмотическим давлением. Например, набухание и уменьшение липосом, образованных в растворах NaCl (с ионами натрия внутри) при помещении их в растворы с низкой и высокой концентрацией соли соответственно. При этом возникает градиент концентрации натрия, генерируются осмотические силы, и происходит отток воды из внутреннего объема липосом. При помещении в гипертонический раствор уменьшение диаметра частиц

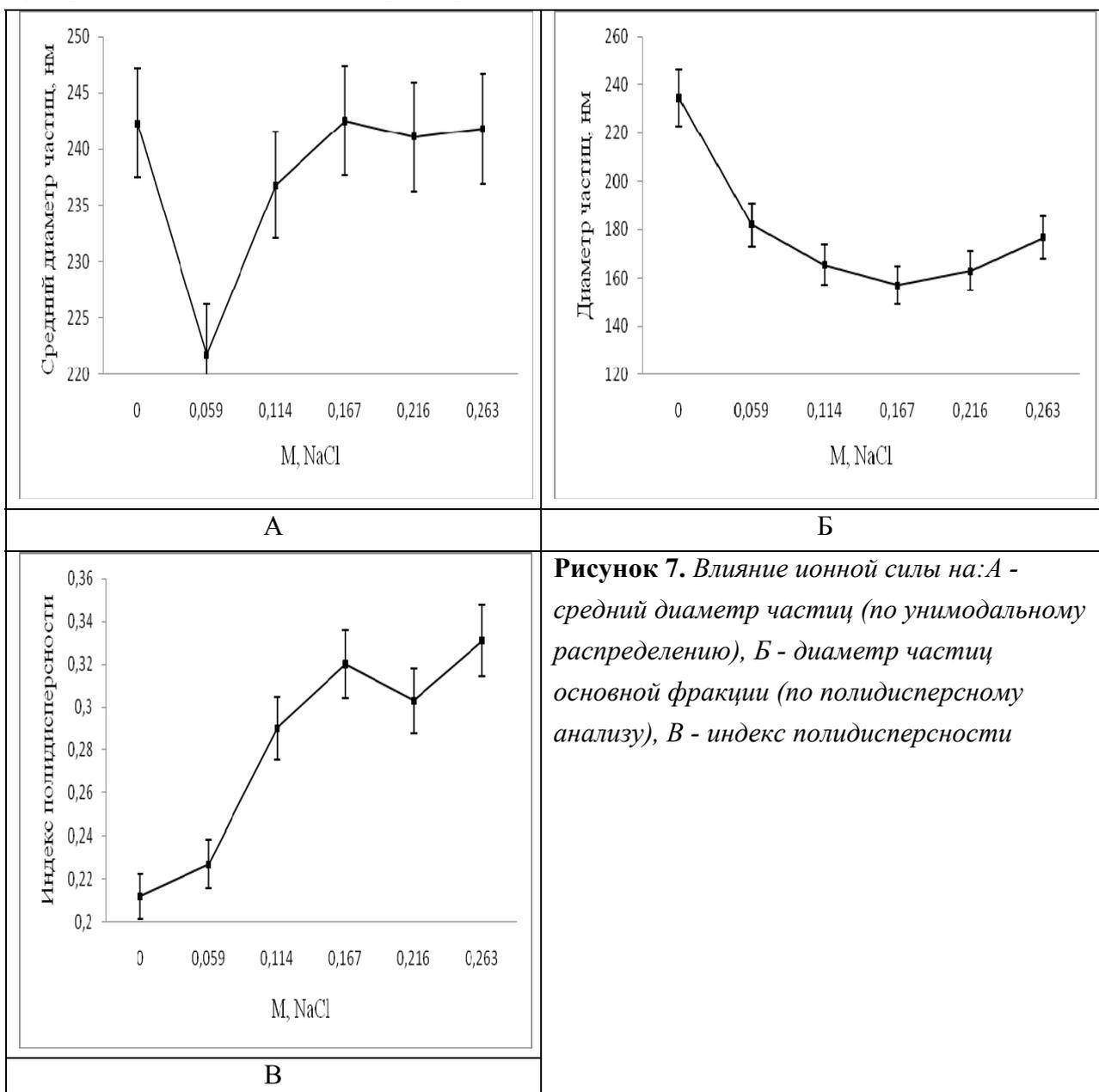
происходит до максимального уплотнения бислоя (Sabin, 2006). Кроме того, помещение наночастиц (липосом) в раствор с повышенной ионной силой вызывает стресс – резко возрастает давление на стенки (на мембрану), которое описывают уравнением  $\Delta p \pi r^2 = \sigma 2 \pi r t$ , при этом  $\sigma = \Delta p (r/2 t)$ . В этих выражениях  $\sigma$  - стресс,  $\Delta p$  – разница между внутренним и внешним давлением,  $t$  – толщина стенки везикулы или мембраны. В исследованиях (Haillet, 1993) показано, что величина стресса ( $\epsilon$ ) является функцией градиента давления:  $\Delta p = (4kt/r) \times \epsilon$ . В связи с этим при возрастании осмотического давления в полидисперсной системе крупные частицы быстрее достигают критического давления  $\Delta p^*$ , что вызывает их разрушение. Таким образом, поведение липосомальных частиц в растворах с разной осмоляльностью служит характеристикой их стабильности.

На рисунке 6 представлены данные, свидетельствующие о влиянии ионной силы раствора на размер наночастиц в образцах полученной нами фосфолипидной эмульсии.



Из рисунка 6 видно, что изменение ионной силы раствора до 0,5 М NaCl не приводит к изменению исследуемых параметров, характеризующих систему: не изменяется средний диаметр частиц при унимодальном анализе; не изменяется индекс полидисперсности. Заметные изменения параметров происходят при увеличении концентрации раствора NaCl выше 0.5 М.

На рисунке 7 представлены результаты по влиянию ионной силы на фосфолипидные наночастицы, размером более 200 нм.



Из рисунка 7 видно, что поведение фосфолипидных наночастиц со средним диаметром  $242 \pm 5$  нм в гипертоническом растворе отличается от такового для наночастиц, размером  $20 \pm 3$  нм. Так, для фракции с размером более 200 нм, содержание которой в исходном образце было выше 80%, увеличение осмотического давления в окружающей среде привело к оттоку воды из внутреннего объема липосом, что и сопровождалось

«сжатию» частиц. При этом доля этой фракции упала до 40%, возросла полидисперсность, появились более мелкие (30-60 нм) и более крупные частицы (500 нм и выше). Эти изменения наблюдали уже при ионной силе 0,06 М NaCl, что свидетельствует о меньшей стабильности частиц, размером более 200 нм.

Сравнение результатов этих экспериментов (рис.6 и 7) показывает, что в интервале 0 – 0,5М NaCl фосфолипидная наноэмульсия с размером частиц 20 нм устойчива к изменению осмотического давления, т.е. упаковка бислоя максимальна (Sabin, 2006). При значениях ионной силы окружающего раствора выше 0,5 М диаметр наночастиц и полидисперсность во всех исследуемых образцах возрастает. Причем увеличение полидисперсности для частиц с исходным размером более 200 нм происходит уже при ионной силе 0,06.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что наночастицы фосфолипидной эмульсии со средним диаметром  $20\pm 3$  нм более устойчивы к воздействию осмотических сил, генерируемых градиентом концентрации натрия, чем частицы фосфолипидной эмульсии с диаметром 200 нм.

***Дзета-потенциал фосфолипидных наночастиц и лекарственных композиций на их основе.***

$\zeta$  (дзета)-потенциал – величина, характеризующая взаимное влияние друг на друга дисперсной среды и диспергированной частицы. Известно, что дзета-потенциал является важным индикатором поверхностного заряда частиц и может быть использован для прогнозирования и контроля устойчивости коллоидных суспензий или эмульсий. Для полной электростатической стабилизации значение дзета-потенциала должно быть между  $| 40 |$  и  $| 60 |$  мВ, для ограниченной флуктуации между  $| 5 |$  и  $| 15 |$  мВ и для максимальной флуктуации  $| 5 |$  и  $| 3 |$  мВ (Heurtault B., 2003).

В таблице 2 представлены значения дзета потенциала фосфолипидных наночастиц и нескольких лекарственных композиций на их основе.

**Таблица 2**

**Значения дзета потенциала фосфолипидных наночастиц и нескольких лекарственных композиций на их основе**

<b>Наименование</b>	<b>Дзета потенциал, мВ</b>
Фосфолипидные наночастицы	- 47±2
Индометацин	-19±2
Арбидол	18±3
Фосфоглив	2±1

Как видно из данных, представленных в таблице 2, дзета потенциалы наночастиц полученной нами фосфолипидной эмульсии и лекарственных композиций на их основе имеют высокие значения, что подтверждает их стабильность.

### 2.3. Получение лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц

Проблема включения лекарственных соединений в наночастицы является одной из наиболее важных в стратегии развития и разработки новых усовершенствованных систем доставки лекарств. В отделе нанолечеств ИБМХ РАМН был проведен скрининг лекарственных соединений на возможность включения их в фосфолипидные наночастицы и были оптимизированы технологические условия получения лекарственных композиций на их основе. В табл. 3 представлены основные физико-химические характеристики лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц, отобранных для дальнейшего изучения в настоящей работе.

Таблица 3

Характеристики лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц

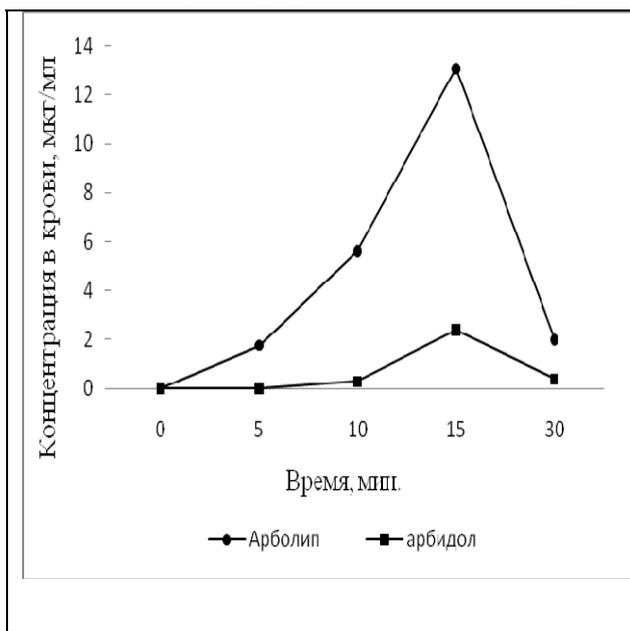
Композиция	Светопропускание до/после фильтрация, %	Размер частиц, нм	Содержание субстанции в 10 мл, мг	Содержание субстанции в составе наночастиц, %	Фармакологическое действие
Фосфолипидные наночастицы	68,3/70,4	19 ± 3			
Арбидол	80/83	8 ± 3	24,5	98	Противовирусное
Доксорубин	75,0/80,6	17 ± 2	23	96	Противоопухолевое
Хлорин Е6	75/80	21 ± 3	24	90	Фотодинамическая терапия и диагностика
Будесонид	2/60	22 ± 5	22,5	100	Противовоспалительное (глюкокортикостероид)
Преднизолон	3/62	18 ± 2	21	95	Противовоспалительное (глюкокортикостероид)

Таким образом, во всех отобранных для дальнейшего исследования образцах композиций размер фосфолипидных наночастиц не превышал 25 нм, а включение лекарственной субстанции было не меньше 95%.

### 3. Изучение транспорта лекарственных соединений с помощью фосфолипидных наночастиц предельно малого размера.

#### 3.1. Биодоступность лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц

Известно, что биодоступность – одна из важнейших фармакокинетических характеристик лекарства. В экспериментах *in vivo* были проведены сравнительные изучения биодоступности лекарственных соединений в полученных композициях. (рис. 8 - 10). На рис. 8 представлена динамика содержания арбидола в крови экспериментальных животных при пероральном введении арбидолсодержащих препаратов.

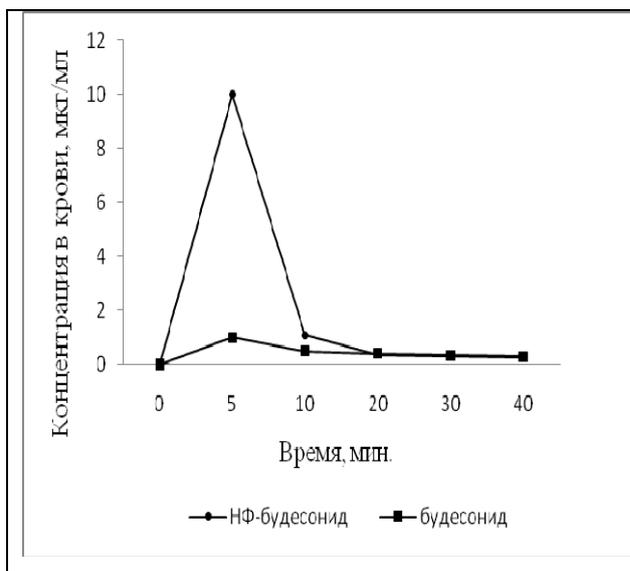


**Рисунок 8.** Изменение содержания арбидола в крови крыс после перорального введения «свободного» арбидола и в составе фосфолипидных наночастиц (Арболип).

Забор крови осуществляли из хвостовой вены в объеме 200 мкл. Экстракцию арбидола осуществляли девятикратным избытком метанола, центрифугировали для осаждения белков. В надосадочной жидкости количественно определяли арбидол методом ВЭЖХ. Погрешность определения не превышала 5%.

Как видно из данных, представленных на рис. 8,  $C_{\max}$  для фосфолипидной композиции приблизительно в 6 раз,  $AUC_{0-30}$  – в 8 раз выше, чем для свободного арбидола. При этом  $t_{\max}$  не изменялось.

На рис. 9 представлены данные по биодоступности будесонида, включенного в фосфолипидные наночастицы при внутрибрюшинном введении

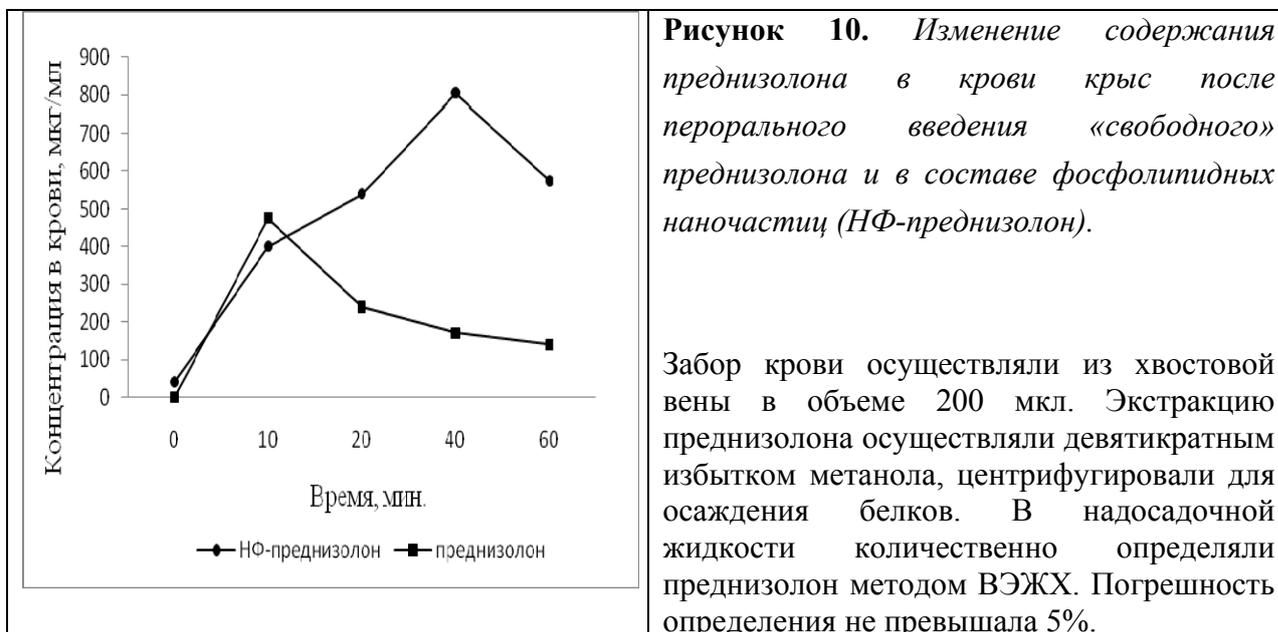


**Рисунок 9.** Изменение содержания будесонида в крови крыс после перорального введения «свободного» будесонида и в составе фосфолипидных наночастиц (НФ-будесонид).

Забор крови осуществляли из хвостовой вены в объеме 200 мкл. Экстракцию будесонида осуществляли девятикратным избытком метанола, центрифугировали для осаждения белков. В надосадочной жидкости количественно определяли будесонид методом ВЭЖХ. Погрешность определения не превышала 5%.

Как видно из представленных данных (рис. 9) биодоступность будесонида, введенного внутривенно, существенно увеличивается: более, чем в 10 раз возрастает  $C_{\text{макс}}$  и в 5 раз величина  $AUC_{0-40}$ .

Аналогичные результаты были получены при изучении биодоступности преднизолона, включенного в фосфолипидные наночастицы (рис. 10).



**Рисунок 10.** Изменение содержания преднизолона в крови крыс после перорального введения «свободного» преднизолона и в составе фосфолипидных наночастиц (НФ-преднизолон).

Забор крови осуществляли из хвостовой вены в объеме 200 мкл. Экстракцию преднизолона осуществляли девятикратным избытком метанола, центрифугировали для осаждения белков. В надосадочной жидкости количественно определяли преднизолон методом ВЭЖХ. Погрешность определения не превышала 5%.

Как видно из данных, представленных на рис. 10, несмотря на то, что  $T_{\text{max}}$  для преднизолона, включенного в фосфолипидные наночастицы, достигается медленнее, значение  $AUC_{0-60}$  в 5 раз выше, чем для свободной субстанции, т.е. биодоступность преднизолона при включении в фосфолипидные наночастицы при пероральном введении также существенно увеличивается.

Анализ полученных результатов показывает, что включение лекарственного соединения в фосфолипидные наночастицы, размером до 30 нм приводит к изменению таких фармакокинетических характеристик, как  $AUC_t$ ,  $t_{\text{макс}}$ ,  $C_{\text{макс}}$ .

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что включение исследуемых труднорастворимых лекарственных соединений в фосфолипидные наночастицы предельно малого размера существенно увеличивает их биодоступность, что должно способствовать увеличению терапевтической эффективности композиции в целом.

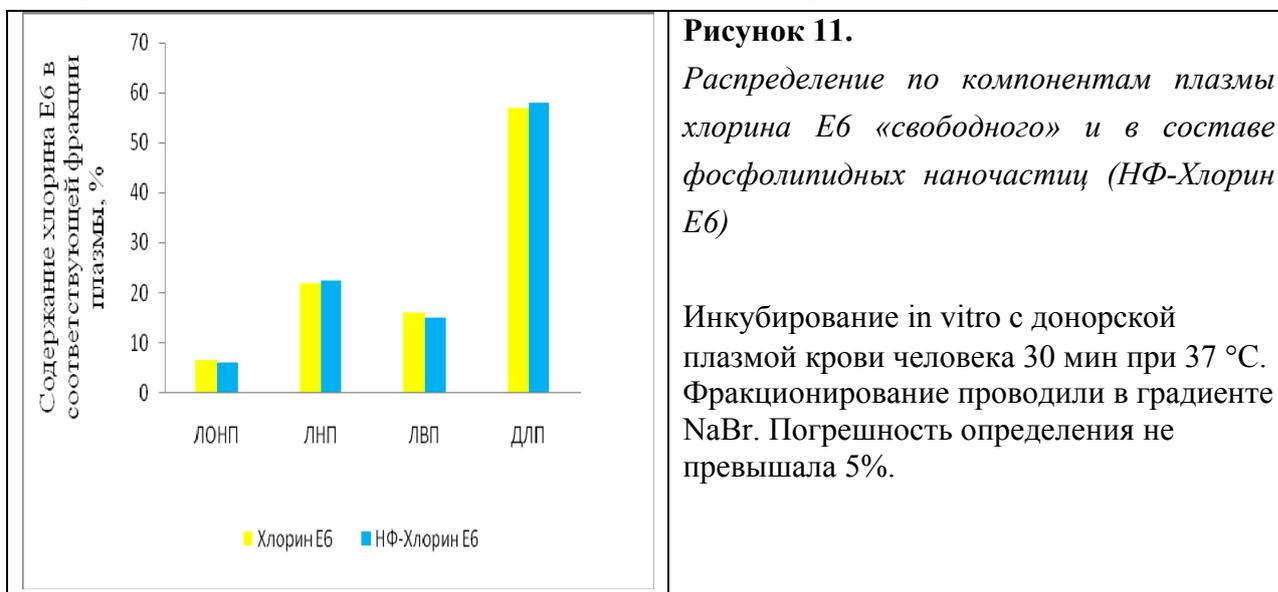
### 3.2. Связывание с компонентами крови лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц

Известно, что изменение распределения лекарственного соединения по компонентам крови напрямую отражается на его фармакокинетических параметрах (Wasan K.M., 1998, 2008). Этот показатель важен для внутривенно вводимых препаратов, т.к. от него зависит скорость поступления лекарства в органы и ткани, распределение в организме, длительность действия.

Были проведены эксперименты *in vitro* по изучению влияния включения лекарственного соединения в фосфолипидные наночастицы на их связывание с компонентами плазмы.

### 3.2.1. Исследование связывания хлорина Е6 с компонентами плазмы

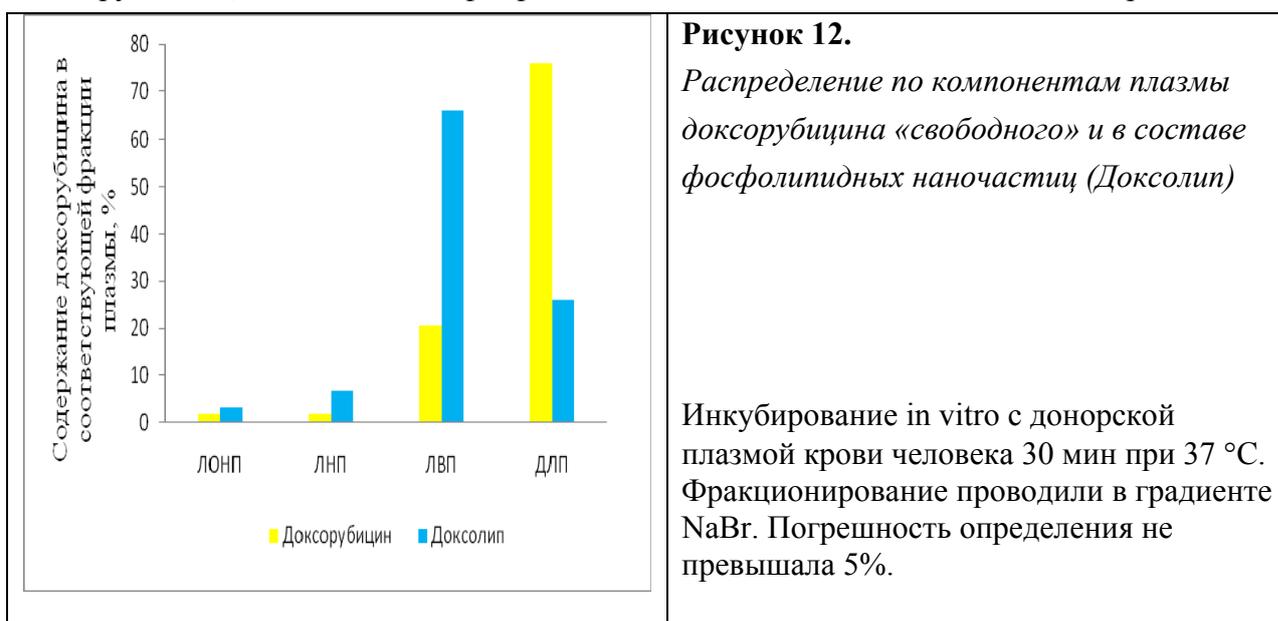
Результаты сравнительного изучения связывания хлорина Е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы, с компонентами плазмы представлены на рис. 11.



Как видно из данных, представленных на рис. 11 распределение хлорина Е6 свободного и встроенного в фосфолипидные наночастицы по фракциям плазмы крови, полученным после ультрацентрифугирования в градиенте плотности – одинаковое, при этом, с белковой фракцией плазмы крови связывается около 60% хлорина Е6, а 40% - находится в связанном состоянии с липопротеинами, 20% из которых связано с ЛНП.

### 3.2.2. Исследование распределения доксорубина по компонентам плазмы

На рисунке 12 представлены результаты сравнительного изучения связывания доксорубина, включенного в фосфолипидные наночастицы с компонентами крови.



Из рис. 12 видно, что включение доксорубина в фосфолипидные наночастицы приводит к существенному изменению его связывания с компонентами плазмы. Так, связывание с белковой фракцией снижается с 75 до 25% по сравнению со свободной субстанцией, увеличивается связывание с фракциями ЛВП и ЛНП. Таким образом, встраивание доксорубина в фосфолипидные наночастицы изменяет его распределение в крови, что может оказать влияние на специфическую активность композиции.

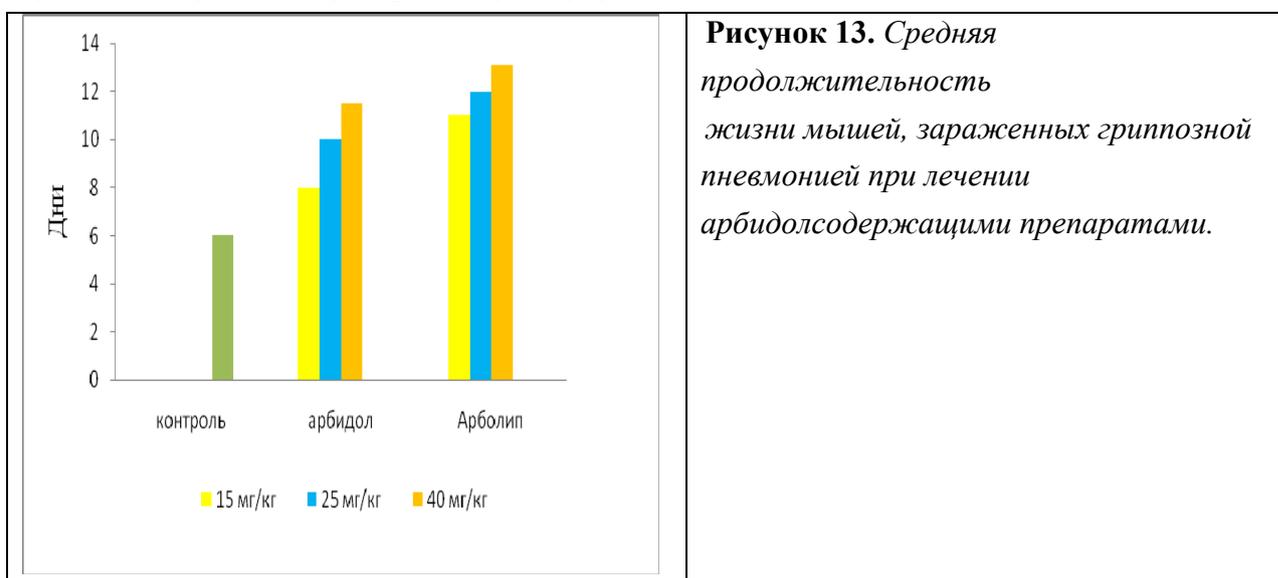
Результаты, представленные на рис. 11 и 12, свидетельствуют о том, что распределение по компонентам плазмы крови зависит от строения, физико-химических свойств лекарственной субстанции и характера ее взаимодействия с фосфолипидной наночастицей.

### 3.3. Изучение специфического действия лекарственных композиций на основе фосфолипидных наночастиц

#### 3.3.1. Изучение специфической активности лекарственной композиции на основе фосфолипидных наночастиц и арбидола

В экспериментах *in vivo* на модели гриппозной пневмонии мышей изучали сравнительную эффективность специфического действия арбидола, встроенного в фосфолипидные наночастицы (Арболип). В качестве препарата сравнения использовали лекарственную субстанцию арбидол. Исследования проводили при участии сотрудников ОАО ЦХЛС-ВНИХФИ.

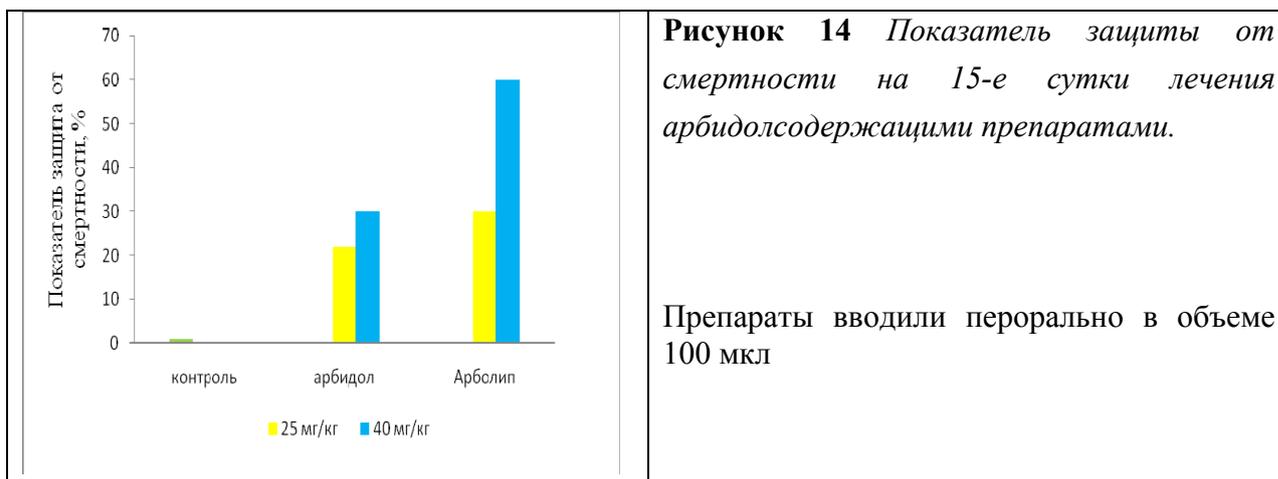
На рис. 13 приведены данные сравнительного изучения эффективности действия арбидолсодержащих препаратов при пероральном введении в дозах 15; 25 и 40 мг/кг.



**Рисунок 13.** Средняя продолжительность жизни мышей, зараженных гриппозной пневмонией при лечении арбидолсодержащими препаратами.

Из рис. 13 видно, что Арболип уже в дозе 15 мг/кг проявлял большую активность по сравнению со свободной субстанцией, а в дозе 40 мг/кг - увеличивал продолжительность жизни экспериментальных животных более чем в 2 раза.

Еще одной важной характеристикой специфической активности противовирусных препаратов является показатель защиты от смертности (рис. 14).



**Рисунок 14** Показатель защиты от смертности на 15-е сутки лечения арбидолсодержащими препаратами.

Препараты вводили перорально в объеме 100 мкл

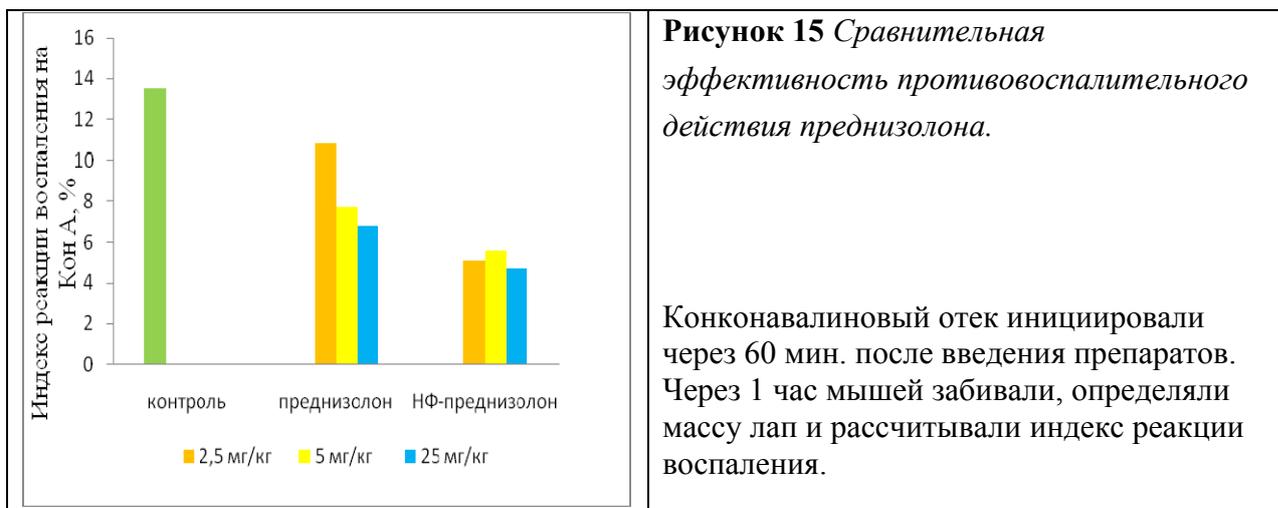
Из рис. 14 видно, что на 15-е сутки лечения Арболипом в дозах 25 и 40 мг/кг показатель защиты от смертности был выше по сравнению с лечением арбидолом. Причем, наилучшую эффективность наблюдали при лечении дозой 40 мг/кг. Все животные контрольной группы погибли на 6-е сутки.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что включение арбидола в фосфолипидные наночастицы приводит к существенному изменению его биодоступности и улучшению специфической активности.

### 3.3.2. Изучение специфической активности лекарственной композиции на основе фосфолипидных наночастиц и преднизолона

Эффективность специфического действия преднизолона, встроенного в фосфолипидные наночастицы (НФ-преднизолон), была изучена в сравнительных экспериментах *in vivo* на модели конкнавалинового отека. В качестве препарата сравнения использовали лекарственную субстанцию преднизолон. Исследования проводили при участии сотрудников лаборатории лекарственной токсикологии НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН.

Результаты сравнительного изучения эффективности действия преднизолона в составе фосфолипидных наночастиц при пероральном введении представлены на рис.15.



**Рисунок 15** Сравнительная эффективность противовоспалительного действия преднизолона.

Конкнавалиновый отек инициировали через 60 мин. после введения препаратов. Через 1 час мышей забивали, определяли массу лап и рассчитывали индекс реакции воспаления.

Из рис. 15 видно, что НФ-преднизолон во всех испытываемых дозах подавлял реакцию воспаления более эффективно, чем свободный преднизолон. Причем, доза в

2,5 мг/кг оказывала более выраженное противовоспалительное действие, чем 25 мг/кг свободного преднизолона

Полученные результаты свидетельствуют, что включение преднизолона в фосфолипидные наночастицы приводит к увеличению специфической активности композиции в целом.

### ***3.3.3. Противоопухолевая фотоиндуцированная активность лекарственной композиции на основе фосфолипидных наночастиц и хлорина Е6***

В экспериментах *in vivo* на мышах с привитой опухолью LLC изучали сравнительную эффективность специфического действия хлорина Е6, встроенного в фосфолипидные наночастицы (НФ-Хлорин Е6). В качестве препарата сравнения использовали коммерческий препарат Радахлорин, в котором действующим веществом является глюкаминовая соль хлорина Е6. Исследования проводили с участием сотрудников Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена.

Методом локальной флуоресцентной спектроскопии изучали флуоресцирующие свойства НФ-Хлорина Е6 в сравнении с Радохлорином в дозе 5,0 мг/кг при внутривенном введении в интервале от 5 секунд до 72 часов.

Анализ флуоресценции показал, что оба препарата быстро поступали во все органы и ткани. В дальнейшем из кожи, мышцы и жировой ткани НФ-Хлорин Е6 выводился в течение 24 часов, а Радахлорин - 48 часов. Быстрое выведение НФ-Хлорина Е6 из кожных покровов важно для снижения светочувствительности (ожоги).

Сравнение фотоактивности НФ-Хлорина Е6 и Радахлорина показало, что оба препарата обладают высокой фотоиндуцированной противоопухолевой активностью. Для НФ-Хлорина Е6 торможение роста опухоли (ТРО) составляет 96,1–100%, увеличение продолжительности жизни (УПЖ) – 57,0%, критерий излеченности (КИ) – 50,0%; для препарата Радахлорин, соответственно ТРО составляет 93,1–100%, УПЖ – 63,3%, КИ – 60,0%.

В целом, исследования показали, что, несмотря на одинаковую фотоиндуцированную противоопухолевую активность препаратов, НФ-Хлорин Е6 отличается быстрым выведением из организма млекопитающих, что важно для лекарств, используемых в фотодинамической терапии.

Таким образом, включение хлорина Е6 в фосфолипидные наночастицы, размером до 30 нм оказывает влияние на его фармакокинетику.

Анализ экспериментальных данных позволяет сделать вывод, что включение лекарственного соединения в фосфолипидные наночастицы предельно малого размера приводит к изменению фармакокинетики препаратов, что проявляется в изменении их биодоступности, распределении по компонентам крови и специфической активности. Полученные результаты свидетельствуют о неселективном транспорте лекарственного соединения в организме с помощью фосфолипидных наночастиц.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате выполнения диссертационной работы была разработана и масштабирована в условиях опытного производства технология получения фосфолипидных наночастиц предельно малого размера, не превышающего 30 нм. Были изучены физико-химические свойства полученных наночастиц, показана их стабильность при хранении в виде ультратонкой эмульсии в течение длительного времени.

На основе фосфолипидных наночастиц и известных субстанций (арбидол, доксорубин, будесонид, преднизолон, хлорин Е6) разработаны опытные образцы лекарственных композиций. Экспериментально показано, что включение лекарственных субстанций в фосфолипидные наночастицы предельно малого размера оказывает существенное влияние на их биодоступность, распределение по компонентам крови, специфическую активность. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования фосфолипидных наночастиц для неселективного транспорта лекарств в организме, а разработанную технологию – для получения новых лекарственных препаратов, отличающихся высокой биодоступностью и терапевтической эффективностью.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана и оптимизирована технология получения фосфолипидных наночастиц диаметром до 30 нм.
2. Определены основные физико-химические характеристики фосфолипидных наночастиц.
3. На примере композиций, полученных на основе арбидола, преднизолона и фосфолипидных наночастиц показано увеличение биодоступности субстанций в 8 и 3 раза соответственно при пероральном введении и для композиции с будесонидом – в 5 раз при внутривенном введении.
4. На примере композиции, содержащей доксорубин, встроенный в фосфолипидные наночастицы, показано в 5 раз большее связывание этой субстанции с липопротеинами низкой плотности и в 3 раза с липопротеинами высокой плотности.
5. Изучение специфической активности лекарств на примере арбидола, хлорина Е6, преднизолона показало существенное повышение их терапевтической эффективности при включении в фосфолипидные наночастицы.
6. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об изменении фармакокинетических параметров лекарств, включенных в фосфолипидные наночастицы размером до 30 нм, что доказывает возможность их использования в качестве универсальной системы транспорта.

## Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Стрекалова О.С., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Торховская Т.И., Медведева Н.В., Сторожаков Г.И., Арчаков А.И. Коматозные состояния: этиопатогенез, экспериментальные исследования, лечение гепатической комы // Биомедицинская химия. – 2009. – Т.55, №4. – С.380–396.
2. Патент 2391966 Российская Федерация, МПК А61К9/127, В82В1/00. Наносистема на основе растительных фосфолипидов для включения биологически активных соединений и способ ее получения / Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Лисица А.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широнин А.В.; заявитель и патентообладатель ООО «ЭкоБиоФарм» - № 2009104784/15; заявл. 13.02.2009; опубл. 20.06.2010.
3. Заявка № 2009104785 Российская Федерация, МПК А61К 47/44, В82В 1/00. Способ получения эмульсии на основе растительных фосфолипидов с использованием устройства для его осуществления / Арчаков А.И., Ипатова О.М., Лисица А.В., Медведева Н.В., Тихонова Е.Г., Стрекалова О.С. Широнин А.В.; заявитель Государственное учреждение Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН - № 2009104785/15; заявл. 13.02.2009; опубл. 20.08.2010, Бюл. №23.
4. Заявка № 2009116832/023150 Российская Федерация Композиция, включающая арбидол в составе фосфолипидных наночастиц / Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Дощицин Ю.Ф., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широнин А.В.; заявитель ООО «ЭкоБиоФарм»; решение о выдачи патента от 22.06.2010.
5. Стрекалова О.С. Способ улучшения биодоступности арбидола // Материалы VI международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность». – Москва. - 2009.- С.213.
6. Стрекалова О.С., Ипатова О.М. Способ получения фосфолипидных наночастиц в технологии производства нанолечеств // Сборник докладов 5-го московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва. - 2009. – Т.1. – С. 203
7. Ипатова О.М., Медведева Н.В., Стрекалова О.С., Прозоровский В.Н., Арчаков А.И. Nanopharmaceuticals: Today and Tomorrow // Materials of The 4th International Conference“Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine”. – N. Novgorod.- 1-7 June 2008. – P.49.
8. Oksana S. Strekalova, Olga M. Ipatova. Phospholipid nanoparticles as a drug delivery system // Materials of The 5th International Conference“Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnologies for Medicine”. – St. Petersburg.-31 May-5 June 2010. – P.92

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- $C_{\text{макс}}$  – максимальная концентрация лекарственного соединения в крови
- $AUC_{0-t}$  – площадь под кривой концентрация препарата – время за интервал  $t$
- $t_{\text{макс}}$  – время достижения максимальной концентрации лекарственного соединения в крови при несосудистом введении
- ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности
- ЛНП – липопротеины низкой плотности
- ЛВП – липопротеины высокой плотности
- ДЛП – делипидированная плазма
- ФХ – фосфатидилхолин