

УДК 615.40:54

## Разработка микро- и наносистем доставки лекарственных средств

Н. И. Ларионова, Д. Дюшен, П. Кувре, **М. Олливон**, Р. Греф

*НАТАЛЬЯ ИВАНОВНА ЛАРИОНОВА — доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Область научных интересов: химическая энзимология, физико-химическая биология, нанобиотехнология.*

*ДОМИНИК ДЮШЕН (D. DUCHÊNE) — почетный профессор факультета Фармации Университета Париж-Юг, Шатнэ-Малабри. Область научных интересов: фармацевтическая технология, биоадгезивные системы доставки лекарств, циклодекстрины.*

*ПАТРИК КУВРЕ (P. COUVREUR) — профессор, директор по исследованиям «Физико-Химия, Фармакотехнология, Биофармация» Лаборатории совместных исследований Национального центра научных исследований 8612 (UMR CNRS 8612). Область научных интересов: фармацевтическая технология, наносистемы доставки лекарств. E-mail patrick.couvreur@cer.u-psud.fr*

**МИШЕЛЬ ОЛЛИВОН (M. OLLIVON)** — доктор философии по химии (PhD), директор по исследованиям Лаборатории фармакохимии полифазных систем Университета Париж-Юг.

*РУКСАНДРА ГРЕФ (R. GREF) — доктор философии по фармации (PhD), исследователь «Физико-Химия, Фармакотехнология, Биофармация» UMR CNRS 8612. Область научных интересов: амфифильные сополимеры, наносистемы доставки лекарств. E-mail ruxandra.gref@cer.u-psud.fr*

*119992 Россия, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, тел. (495)939-34-17, E-mail nilar@enzyme.chem.msu.ru*

*Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, 5 rue J-B Clément – 92296 Châtenay-Malabry, France, тел. +33-01-46835583, E-mail dominique.duchene@cer.u-psud.fr*

### Введение

Сотрудничество научной группы «Биомедицинское применение белков и ферментов. Фарма-биотехнология» кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ с исследователями различных научных групп Факультета Фармации Университета Париж-Юг началось в 1995 г. с визита в Москву профессора Доминика Дюшен, бывшей в то время президентом французской фармацевтической ассоциации «Association de pharmacie galénique industrielle» (APGI). В 1997—2000 гг. совместные экспериментальные работы велись в рамках гранта НАТО (NATO Linkage Grant № 960962) и присоединенного к нему соглашения (LG-Computer Networking Supplement CNS № 972320) при финансовой поддержке Министерства науки и технологий Российской Федерации.

В начале сотрудничества для увеличения биодоступности белков при их пероральном введении был использован более чем 30-летний опыт работы российской группы с белковыми ингибиторами протеиназ [1, 2].

Идея работы состояла в разработке микрокапсул из полимера, обладающего адгезией к слизистым оболочкам (мукоадгезивного). Микрокапсулы ферментативно разлагаются в тонком кишечнике — основном участке абсорбции (или всасывания) веществ. В эти микрокапсулы предстояло включить белок и ингибитор протеиназ. Предполагалось, что при разрушении микрокапсул, прикрепленных к стенкам тонкого кишечника, белок и ингибитор протеиназ будут постепенно высвобождаться в непосредственной близости от места всасывания (рис. 1). При этом активность протеиназ тонкого кишечника, расщепляющих целевой белок и являющихся основной причиной снижения его биодоступности, должна быть в значительной степени подавлена включенным ингибитором.

### Влияние различных факторов на морфологию и размер микрокапсул

В качестве одного из компонентов для микрокапсул был выбран крахмал в виде микрочастиц «Spherex»

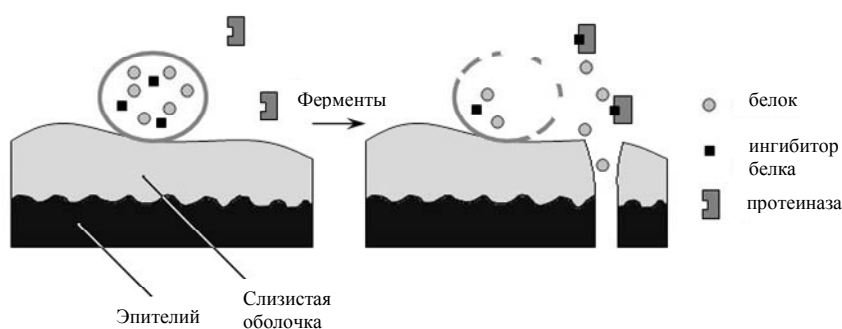


Рис. 1. Принцип действия мукоадгезивных микрокапсул, содержащих белок и ингибитор протеиназ

производства фирмы «Pharmacia», Швеция. Кроме того, на Факультете Фармации Университета Париж-Юг имелся опыт работы с крахмальными микрочастицами [3]. Однако предстояло разработать метод получения микрокапсул с включенными белками, который бы существенно не снижал их биологической активности. Нами был предложен процесс межфазного сшивания растворимого крахмала или гидроксиэтилкрахмала и бычьего сывороточного альбумина (БСА) с помощью терефталойл хлорида [4]. Ингибитор протеиназ — апротинин, либо нативный, либо с защищенным активным центром был микрокапсулирован при его введении в состав водной фазы. Было исследовано влияние величины рН водной фазы, концентраций БСА и сшивающего агента, а также скорости перемешивания на морфологию и размер микрокапсул.

Форма лиофилизированных частиц (сплюснутая сфера) свидетельствовала о получении микрокапсул или частиц резервуарного типа (рис. 2). Приготовленные таким образом микрокапсулы не повреждались после лиофилизации и легко восстанавливали свою сферическую форму после регидратации в буферной среде.

Величина рН водной фазы являлась определяющим

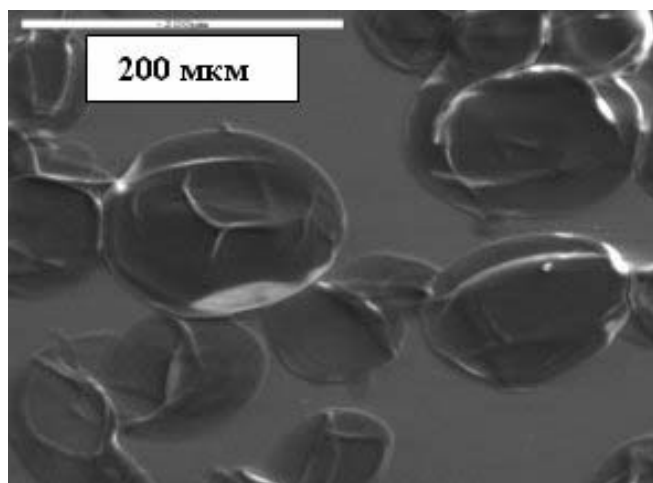


Рис. 2. Сканирующая электронная микрофотография лиофилизированных крахмальных микрокапсул, содержащих апротинин [4]

фактором при получении прочных микрокапсул с высоким выходом. Размер микрокапсул составил 10—30 и 50—100 мкм при скоростях перемешивания 1500 и 500 об/мин соответственно. Методом ИК-спектроскопии была изучена структура мембран микрокапсул, приготовленных в различных условиях. Полученные нами результаты свидетельствовали о вовлечении гидроксильных групп крахмала, аминогрупп, карбоксильных групп и гидроксигрупп остатков серина, треонина и тирозина белка в реакции поликонденсации при увеличении рН водной фазы.

### Дегградация микрокапсул

Чувствительность микрокапсул к дегградации была изучена для ряда ферментов, способствующих разрушению связей, образовавшихся при формировании их стенок [4, 5]. Микрокапсулы оказались устойчивыми к действию раствора эстеразы (19 IU/мл).  $\alpha$ -Амилаза (0,2—1 мг/мл), напротив, оказывала наибольшее деструктивное действие на микрокапсулы, причем использование панкреатина (1 мг/мл) и эстеразы (1 мг/мл) в дополнение к  $\alpha$ -амилазе лишь очень незначительно увеличивало скорость растворения микрокапсул. Слабая дегградируемость микрокапсул под действием смеси протеолитических ферментов свидетельствовала о низком содержании БСА в стенке микрокапсулы, которое связано с относительно низкой его концентрацией (1—5%) в водной фазе при получении микрокапсул.

Белок освобождался из капсул только в результате ферментативного расщепления их стенок. Утечки белка из капсул при их выдержке в буферном растворе не наблюдалось. Однако, несмотря на то, что при действии  $\alpha$ -амилазы (0,2 мг/мл) из микрокапсул за 6 ч освободилось 45% белка, антитрипсиновую активность в среде обнаружить не удалось. Отсутствие ингибирующей активности и сравнительная устойчивость стенки капсулы к энзиматическому перевариванию могло быть следствием интенсивного сшивания растворимых полисахаридов и белков, которое создавало стерические препятствия для эффективного взаимодействия ферментов с макромолекулярными субстратами (белком и крахмалом) и белковым ингибитором. Чтобы уменьшить степень связывания производных крахмала и белков, микрокапсулы были обработаны слабощелочным буфером. Это привело к практически полному освобождению белка и обнаружению 45% от введенной в капсулы ингибирующей активности нативного апротинина при воздействии  $\alpha$ -амилазы. Одной из возможных причин инактивации половины молекул апротинина могла быть модификация аминогруппы активного центра ингибитора (Lys 15). Для предотвращения ацилирования аминогрупп апротинина терефталойл хлоридом при капсулировании был использован апротинин, аминогруппы кото-

Таблица 1

**Ингибирование репродукции бычьего герпес вируса-1 нативной и микрокапсулированной формами аprotинина**

Апротинин	Снижение инфекционного титра вируса (lg ТЦД* <sub>50</sub> /мл)	Задержка цитопатического действия, ч
Нативный, ТИУ/мл	660	24
	800	24
	3300	96
Микрокапсулированный, ТИУ/мл	500	72
	1050	144
	2000	144

\* ТЦД — тканевая цитопатическая доза

рого были обратимо защищены цитраконилированием. Это дало возможность обнаружить 100% антипротеиназную активности апротинина после деградации капсул α-амилазой.

**Антивирусная активность микрокапсулированных препаратов**

Защитный эффект микрокапсул с апротинином для БСА исследовался *in vitro*. Было показано наличие нативного БСА после инкубирования микрокапсул с апротинином в смеси с α-амилазой (5,4 U/мл) и трипсином (900 спектрофотометрических ВАЕЕ единиц/мл) в течение 3 часов при 37 °С, в то время как белок полностью переваривался в указанной среде, если микрокапсулы не содержали апротинина. Проведенное исследование продемонстрировало пригодность микрокапсул из растворимого крахмала и БСА, содержащих апротинин в качестве ингибирующей протеазу добавки, для получения пероральных форм доставки терапевтически активных пептидов или белковых лекарств.

Совместные экспериментальные работы в 2001—2002 гг. велись при финансовой поддержке Министерства науки и технологий Российской Федерации в рамках межправительственных соглашений о научном сотрудничестве в области сельского хозяйства. Была исследована антивирусная активность крахмальных микрокапсул с апротинином [6—9]. Протеолиз вирусных белков является одним из фундаментальных явлений в репликации вирусов. Ранее была показана возможность ингибирования репликации респираторных вирусов человека в культуре клеток человека и в куриных эмбрионах с помощью апротинина. Вирусные и бактериальные респираторно-кишечные инфекции крупного рогатого скота являются основными причинами заболеваемости и гибели молодняка сельскохозяйственных животных. Поэтому актуальна разработка и изучение биоадгезивных систем, которые могли бы обеспечить доставку антивирусных агентов в верхние дыхательные пути — «ворота» инфекции.

В табл. 1 приведены результаты исследования влияния нативного и микрокапсулированного апротинина на репродукцию бычьего герпес вируса-1 (БГВ-1) в культуре перевиваемой линии клеток легкого эмбриона коровы. Присутствие апротинина в поддерживающей среде в дозе ≥ 800 ТИУ/мл уменьшало инфекционный титр вируса БГВ-1 на 2—4 логарифмических единицы. Кроме того, цитопатическое действие вируса проявлялось на 24—96 часов позже, чем в контрольных образцах.

Апротинин, капсулированный в биодеградируемых микрокапсулах, значительно сильнее подавлял репродукцию вируса, чем нативный ингибитор. Это может быть связано с постепенным высвобождением ингибитора протеиназ в среду после энзиматического разрушения микрокапсул (рис. 3) и связыванием апротинина с водорастворимым фрагментом-носителем, образующимся в результате действия амилазы. Эта форма апро-

тинина, по-видимому, метаболизируется клетками медленнее, чем нативный ингибитор.

Полученные результаты показывают возможность подавления репродукции вируса БГВ-1 различными формами апротинина. Поскольку механизм протеолитической активации вирионов протеиназами организма хозяина присущ широкому кругу респираторных вирусов, можно ожидать, что препараты на основе апротинина будут обладать широким спектром антивирусного действия. Перечисленные достоинства могут способствовать созданию на основе апротинина высокоэффективного средства против респираторных вирусов. Готовая лекарственная форма апротинина в виде биоадгезивных крахмальных микросфер представляется перспективной, поскольку в условиях *in vivo* может дать дополнительное преимущество, связанное с усилением перехода апротинина на респираторный эпителий и пролонгированием действия.

Результаты исследования белковых ингибиторов протеиназ, капсулированных в крахмальные микрокапсулы, доложены на 9 международных конференциях и симпозиумах [10—18].

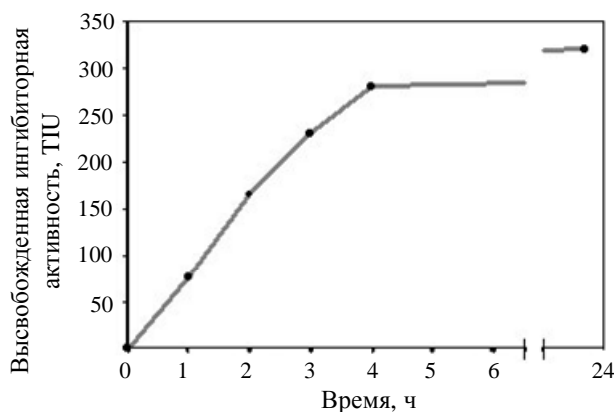


Рис. 3. Кинетика высвобождения активного апротинина из крахмальных микрокапсул [8]

**Липосомальные системы доставки лекарственных препаратов**

Вторым направлением совместных исследований было создание и изучение липосомальных форм белков. Известно, что использование липосом для доставки лекарств имеет ряд важных преимуществ. Во-первых, фосфолипиды — структурные компоненты липосом — являются основными компонентами клеточных мембран. Они нетоксичны, биodeградируются, мембрана липосом может сливаться с клеточной мембраной, что обеспечивает внутриклеточную доставку их содержимого. Во-вторых, вещество в липосомах защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, склонных к разложению в биологических жидкостях. В-третьих, высвобождение лекарств из липосом происходит постепенно и достигается эффект пролонгированного действия. Все эти преимущества позволяют уменьшить терапевтические дозы лекарств, что очень важно при применении препаратов с побочными действиями.

Целью нашей работы являлось создание липосомальных систем доставки аprotинина и соевого ингибитора протеиназ типа Баумана—Бирк (ИББ), изучение антипротеиназной активности белков в составе протеолипосом и оценка поведения разработанных систем в

средах, моделирующих различные отделы желудочно-кишечного тракта. Нами были разработаны и оптимизированы методы включения аprotинина и ИББ в отрицательно заряженные и нейтральные липосомы из фосфолипидов сои [19, 20]. Состав использованных липидных препаратов, выделенных из бобов сои, представлен в табл. 2.

Методом гель-фильтрации с одновременной детекцией светорассеяния липосом и флуоресценции белка было показано взаимодействие аprotинина с соевым и моноламеллярными везикулами разного состава при pH 3,0 и 8,0 [21]. Более того, было обнаружено, что добавление раствора белка к дисперсии фосфолипидов вызывает их агрегацию, что позволяет легко отделять протеолипосомы от компонентов, не вступивших во взаимодействие. Методом турбидиметрии было подтверждено, что комплексообразование аprotинина с соевыми фосфолипидами сопровождается pH-зависимой агрегацией липосом и образованием осадка. Исходя из этого, было предложено получать липосомы осаждением.

Результаты количественного определения компонентов в составе протеолипосом, полученных в оптимальных условиях, показали, что содержание белков в протеолипосомах увеличивается с понижением pH среды и с увеличением доли кислых липидов в смеси (табл. 3)

Таблица 2

**Состав липидных препаратов, выделенных из соевых бобов и использованных для получения липосом**

Препарат	Содержание липидов, % массы препарата	Нефосфолипидные примеси, % от массы препарата			Содержание индивидуальных фосфолипидов, % суммы всех фосфолипидов				
		жирные кислоты	сапонины	белки	ФХ	ФЭ	ФИ	ФГ	л-ФХ
ЛП-1	59±3	8±1	30±2	4,5±0,5	42±2	20±2	18±2	13±1	7±1
ЛП-2	87±3	11±1	—	3,5±0,3	42±2	20±2	18±2	13±1	7±1
ЛП-3	100	—	—	—	56±2	20±2	8±1	8±1	7±1
ЛП-4	100	—	—	—	45±2	22±2	33±2	—	—
ЛП-5	100	—	—	—	33±2	67±2	—	—	—
ЛП-6	100	—	—	—	50±2	50±2	—	—	—
ЛП-7	100	—	—	—	67±2	33±2	—	—	—
ЛП-8	100	—	—	—	100±2	—	—	—	—

Таблица 3

**Сравнительная характеристика протеолипосом**

Липидный препарат	Эффективность включения белка в протеолипосомы, %(масс.) от исходного содержания		Средний диаметр протеолипосом, нм	
	Аprotинин	ИББ	Аprotинин	ИББ
ЛП-1	50±3	73±2	360±20	1330±50
ЛП-2	65±3	63±3	1120±50	1430±50
ЛП-3	35±2	49±2	2270±100	1600±70
ЛП-4	25±2	40±2	2400±100	1700±70
ЛП-5	20±2	20±3	500±25	460±25
ЛП-6	18±3	28±6	580±30	530±25
ЛП-7	16±2	18±3	580±30	600±30
ЛП-8	11±2	14±3	580±30	580±30

[19, 20]. Гораздо меньшее количество белка связывается с фосфолипидами цвиттер-ионами [22]. Результаты по определению содержания белка в составе протеолипосом показывают, однако, что наличие 50 и более процентов ФЭ в смеси с ФХ приводит к достаточно эффективному связыванию с обоими белками (табл. 3). Например, для смеси ФХ/ФЭ = 33/67 (ЛП-5) содержание белка возрастает в два раза по сравнению с дисперсией ФХ (ЛП-8). Здесь, очевидно, не последнюю роль играет уникальная третичная структура нативного ИББ — 61%  $\beta$ -листов и 38% неупорядоченной структуры, отсутствие спиралей, наличие семи дисульфидных связей. Кроме того, для ИББ характерно отсутствие типичного для белков гидрофобного ядра и большая площадь экспонированных гидрофобных остатков  $>1000 \text{ \AA}^2$ . Что касается аprotинина, то прочные стэкинг-взаимодействия между ароматическими остатками, формирующими гидрофобную область, вероятно, увеличивают эффективность взаимодействия аprotинина с агрегатами фосфолипидов. Гидрофобность полипептидов обычно слишком низка, чтобы эффективно связываться с фосфолипидами цвиттер-ионами. Редкими исключениями являются, например, некоторые токсины, меллитин, магаинины с протяженными спиральями в структуре. В этом контексте наши результаты впервые показывают, что с фосфолипидами цвиттер-ионами способен связываться водорастворимый белок без спиральных элементов структуры.

При образовании протеолипосом, приготовленных из фосфолипидов разного состава, включение аprotинина в отрицательно заряженные липосомы снижалось в 2 раза с увеличением концентрации ионов до 1 М [21]. Таким образом, при увеличении доли отрицательно заряженных компонентов в составе мультламеллярных везикул, понижении pH среды и уменьшении ионной силы связывание таких немембранных водорастворимых белков, как ИББ и аprotинин, увеличивается. На этом основании можно сделать вывод о преимущественном участии электростатических сил при связывании

ИББ и аprotинина с отрицательно заряженными липосомами. Этот тип взаимодействия может осуществляться между положительно заряженными аминокислотными остатками молекулы белка (например, лизин, аргинин) и отрицательно заряженными головками фосфолипидов.

В то же время содержание аprotинина в протеолипосомах, приготовленных из дисперсии ФХ/ФЭ = 50/50, резко уменьшалось при изменении концентрации NaCl от 0 до 0,1 М. Дальнейшее увеличение ионной силы не влияло на количество включенного белка. Это свидетельствовало в пользу того, что наряду с гидрофобными силами взаимодействие между аprotинином и фосфолипидами цвиттер-ионами обеспечивалось в значительной степени и электростатическими силами. Включение ИББ в протеолипосомы не зависело от ионной силы, вплоть до концентрации NaCl 2 М.

Визуализация частиц методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (рис. 4) показала, что белок (затемненные области внутри везикул) находился в самом центре везикулы (основная доля) и между слоями мультламеллярных липосом.

Антипротеазная активность аprotинина в комплексе с отрицательно заряженными мультламеллярными везикулами различного состава не превышала 5% [19]. Антипротеазные активности аprotинина в составе протеолипосом из фосфолипидов цвиттер-ионов сохраняются приблизительно на 40%, в то время как ИББ в составе протеолипосом проявляет активность в 2 раза меньшую, чем аprotинин [23]. Снижения антипротеазной активности обоих белков при включении в липосомы следовало ожидать, исходя из данных о том, что белок локализован преимущественно внутри липидных агрегатов — его активные центры могут быть пространственно недоступны.

При полном или частичном снятии пространственного экранирования активных центров возможно проявление более высокой биологической активности. Для

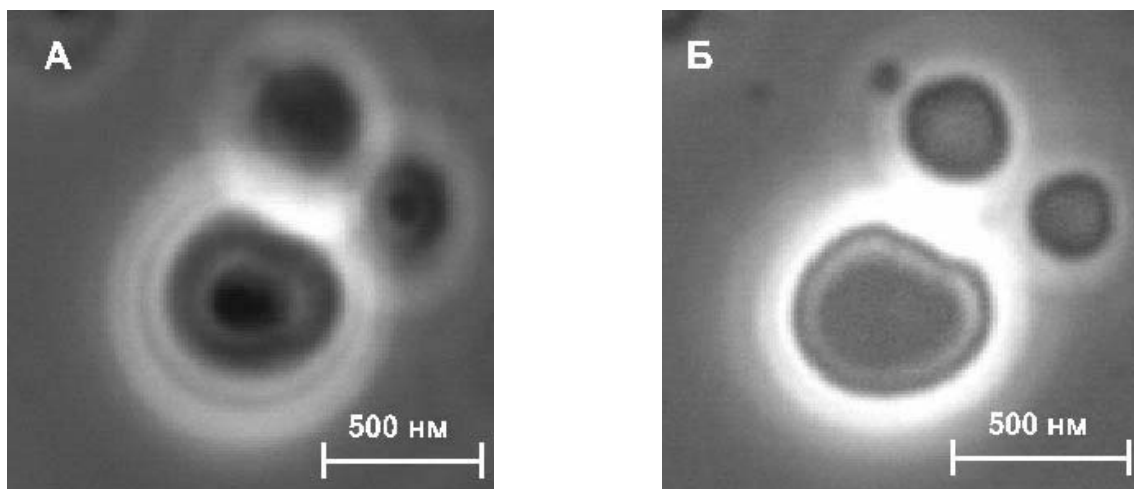


Рис. 4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия липосом, содержащих ИББ:

А — поперечное сечение; Б — центральное поперечное сечение; ФХ/ФЭ = 50/50; расстояние между сечениями 180 нм

проверки этого предположения исследовали влияние ионного поверхностно-активного вещества — дезоксихолата натрия (ДОХ) на изучаемые системы. В соответствии с общепринятой моделью действия ПАВ, при инкубации образуются смешанные везикулы фосфолипидов и ДОХ, связывающие белок меньшего размера, чем протеолипосомы. При действии 2,5% ДОХ на протеолипосомы из отрицательно заряженных мультимеллярных везикул и апротинина, активность ингибитора возрастала на 20—60% в зависимости от липидного состава. Взаимодействие протеолипосом из фосфолипидов цвиттер-ионов с раствором 15 мМ ДОХ, отражающим содержимое дуоденума после еды приводило к повышению антипротеазной активности препаратов в среднем в 1,5 раза. Таким образом, в присутствии ионного ПАВ белок частично связан с везикулами, в которых активные центры ингибиторов более доступны для реакции с протеазами.

Липосомы, содержащие флуоресцентно меченые белки, исследовали в трех средах, моделирующих физиологические [23]. Раствор пепсина 0,16% (рН 1,7) моделирует кислую ферментную среду желудка, а раствор 0,005% панкреатина (рН 8,0) с некоторым содержанием липаз, моделирует воздействие среды на липосомы в верхнем отделе тонкого кишечника. Растворы ДОХ (4 и 15 мМ) моделируют содержимое дуоденальной жидкости натощак и после еды соответственно. Уменьшение интенсивности флуоресценции обоих белков и сдвиг спектров флуоресценции в область больших длин волн после инкубации частиц в различных средах наблюдается во всех случаях и свидетельствует о переходе белков в более гидрофильное окружение, иными словами об их высвобождении в раствор из липосом (рис. 5). Максимально эффективно происходит высвобождение белков из липосом под действием раствора панкреатина, где липазы были специально активированы ионами Са и, по-видимому, более эффективно разрушали липидные частицы.

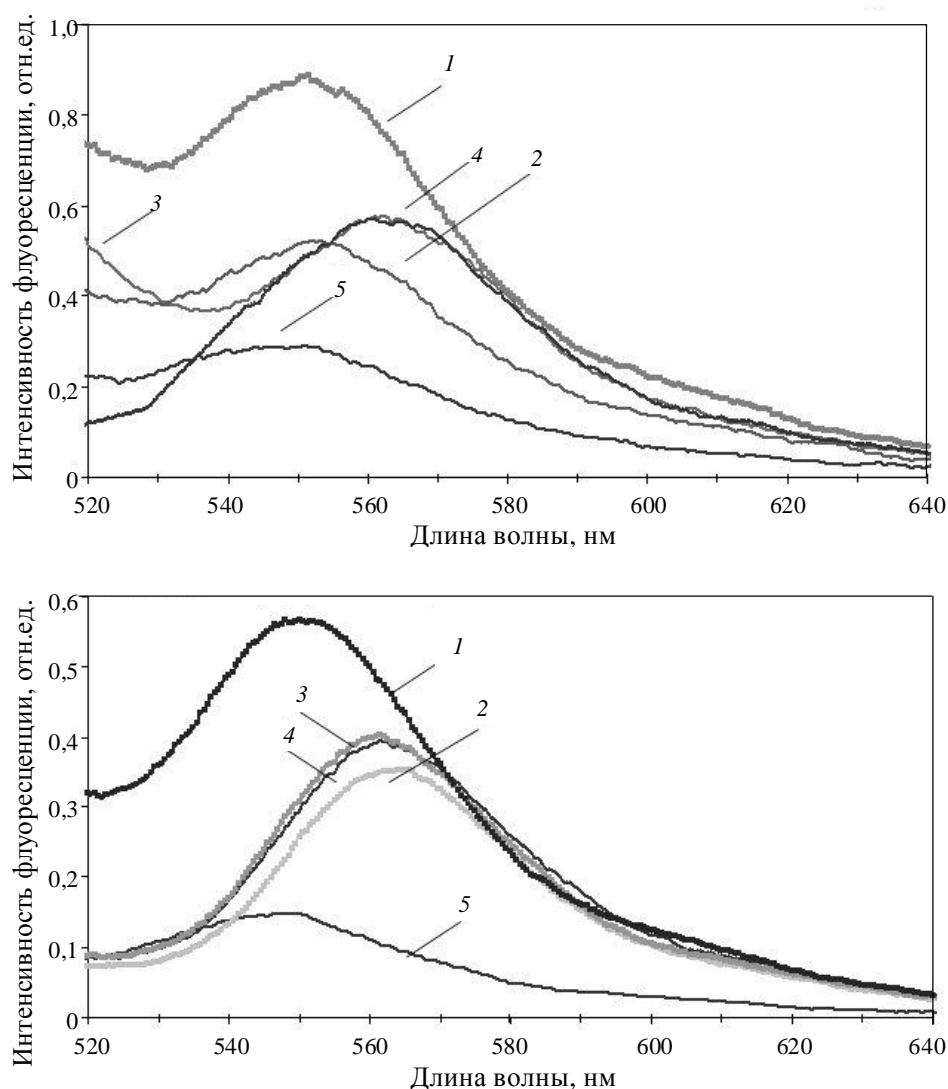


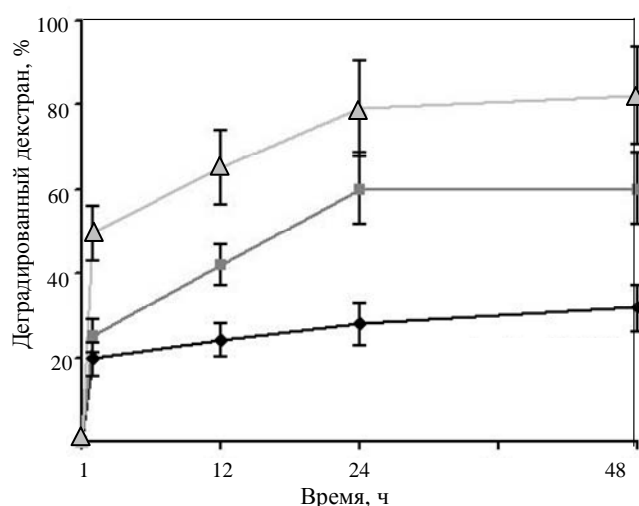
Рис. 5. Спектр флуоресценции липосом из смеси ФХ/ФЭ (50/50), содержащих апротинин (а) или ИББ (б):

1 — до инкубации, 2 — после инкубации в течение 1 ч при 37 °С в растворе пепсина; 3 — 4 мМ ДОХ; 4 — 15 мМ ДОХ; (5) — в растворе панкреатина

Результаты исследования липосомальных форм белковых ингибиторов протеиназ доложены на двух российских [24, 25] и трех международных симпозиумах [26—28].

#### Наносистемы на основе амфифильных сополимеров

Третьим направлением совместных исследований была разработка и изучение наносистем на основе амфифильных сополимеров. Разработка методов получения амфифильных сополимеров и исследование свойств исходных полимеров и наносистем на их основе является актуальным и перспективным междисциплинарным направлением, объединяющим современную химию высокомолекулярных соединений и фармацевтическую нанобиотехнологию.



**Рис. 6.** Кинетика деградации наночастиц Дек-ПКЛ декстраназой:

1 мг/мл наночастиц Дек-ПКЛ, 0,1 мг/мл декстраназы; 50 мМ ацетатный буфер; pH 5,5; 37 °C; содержание декстрана в блоксополимере: ♦ — 10% (Дек<sub>10</sub>-ПКЛ); ■ — 23% (Дек<sub>23</sub>-ПКЛ); ▲ — 33% (Дек<sub>33</sub>-ПКЛ).

В работе использовали серию амфифильных привитых блоксополимеров декстран-поли-ε-капролактона (Дек-ПКЛ) с различным содержанием декстрана 10—33%, синтезированных на Факультете Фармации, Университета Париж-Юг [29]. Наночастицы Дек-ПКЛ, полученные методом осаждения, представляли собой сферические частицы диаметром 100—260 нм [30].

Исследована ферментативная деградация Дек-ПКЛ наночастиц декстраназой и липазой, так как известно, что данные ферменты присутствуют в организме человека и животных [31]. Полученные данные свидетельствуют о том, что цепи декстрана доступны для ферментативного расщепления. Из кинетики деградации наночастиц (рис. 6) видно, что в первые часы расщепляется приблизительно половина максимально возможного количества цепей декстрана. По-видимому, такое течение ферментативного гидролиза обусловлено первоначальным расщеплением декстраназой легко доступных α-1,6-гликозидных связей петель декстрана на поверхности наночастиц, после чего происходит медленное расщепление стерически защищенных цепей декстрана в объеме частицы.

Изучение электрокинетического потенциала деградации наночастиц показало, что дзета-потенциал уменьшается по мере инкубации наночастиц с декстраназой. После 48 часов деградации наночастицы практически полностью теряют свою декстрановую оболочку и их заряд приближается к заряду отрицательно заряженного поликапролактонового ядра.

Проведен скрининг липаз различной природы. В работе исследовано не только действие индивидуальных ферментов, но и ферментативных смесей (Lipolase, Resinase). Полученные данные описывают лишь возможность использования данного типа липаз для рас-

щепления цепей поликапролактона. Исходя из данных по ферментативной деградации наночастиц, были выбраны препараты липаз из *Pseudomonas sp.* и Lipolase 100T с высокой активностью по отношению к поликапролактоновому ядру наночастиц. Методом электронной микроскопии также показана возможность ферментативного расщепления поликапролактоновых микро-частиц данными липазами. За 10 минут деградации при микромолярной концентрации фермента из *Pseudomonas sp.* происходило полное разрушение наночастиц. Скорость разрушения наночастиц полимера с меньшим содержанием цепей декстрана была выше. Такие результаты могут быть объяснены структурой наночастицы. Так как ферментативный гидролиз липазой обычно осуществляется на границе раздела фаз, то следовало ожидать снижения скорости реакции с увеличением Дек-оболочки, препятствующей проникновению фермента к субстрату для наночастиц Дек<sub>23</sub>-ПКЛ и Дек<sub>33</sub>-ПКЛ.

Разработаны и оптимизированы методы включения белков различных молекулярных масс и гидрофильности в Дек-ПКЛ наночастицы [32]. В качестве модельных белков использовали ИББ и БСА. Методом двойного эмульгирования показана высокая эффективность включения ИББ в наночастицы (табл. 4). Максимальная эффективность включения ИББ в наночастицы составила 75% в этилацетате и 85% в метиленхлориде. Таким образом, установлено, что использование более гидрофобных полимера Дек<sub>10</sub>-ПКЛ и растворителя позволяет увеличить эффективность включения модельного белка. Известно, что молекула ИББ обладает выраженными гидрофобными свойствами, следовательно, полученный результат связан исключительно с природой самого ИББ. Действительно, нами было показано, что использование более гидрофильного белка — БСА приводит к значительному снижению эффективности включения в полимерные наночастицы (табл. 4). Средний размер частиц Дек-ПКЛ с включенным ИББ составлял 170—250 нм.

Таблица 4

**Эффективность включения ИББ и БСА в Дек-ПКЛ наночастицы**

Блоксополимер декстран-поли-ε-капролактона*	Эффективность включения, %	
	ИББ	БСА
Дек <sub>10</sub> -ПКЛ	75	7
Дек <sub>23</sub> -ПКЛ	58	8,6
Дек <sub>33</sub> -ПКЛ	55	10

\* Цифрами обозначено содержание декстрана в %. Растворитель — этилацетат

Исследована возможность высвобождения белка из Дек-ПКЛ наночастиц в различных средах (рис. 7, кривые 1—3). Продемонстрирована зависимость скорости высвобождения ИББ от pH среды и присутствия декстраназы. Показано, что за сутки под действием декстра-

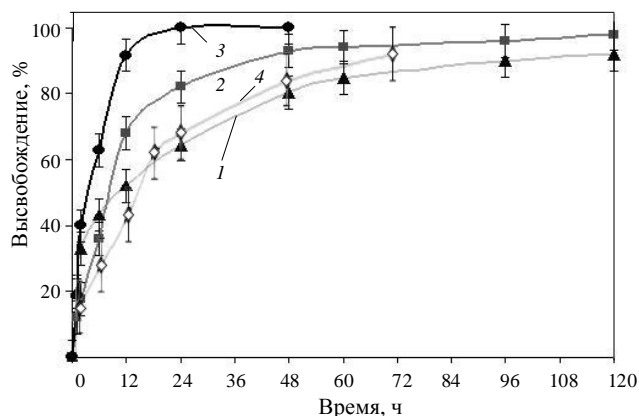


Рис. 7. Высвобождение ИББ из Дек<sub>10</sub>-ПКЛ наночастиц:

1, 3 — в 0,05 М ацетатном буфере (рН 5,5; 37 °С) без декстраназы (1) и в присутствии декстраназы (3); 2 — в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,4; 37 °С); 4 — высвобождение тамоксифена из наночастиц Дек<sub>10</sub>-ПКЛ в 0,05 М фосфатном буфере (рН 7,4; 37 °С) с 0,5% лаурилсульфата натрия

назы при оптимальном для ее активности рН белок полностью высвобождается. При этом активность ИББ составила 82%, что говорит об устойчивости белка к процессам включения и деградации [33].

Биодеградируемые наночастицы из амфифильных сополимеров в последнее время привлекают внимание исследователей в качестве систем доставки противоопухолевых лекарственных средств благодаря высокой эффективности включения лекарств, повышенной способности к преодолению различных физиологических барьеров, ускоренной экстравазации в опухоль и меньшим системным побочным эффектам. В данной работе это было продемонстрировано на примере тамоксифена [31]. Тамоксифен является синтетическим производным трифенилэтилена и обладает выраженными антиэстрогенными свойствами. Высокий терапевтический потенциал лекарственного средства ограничен плохой растворимостью в водной среде (менее 0,01 мг/мл). Нам удалось включить тамоксифен в наночастицы Дек<sub>10</sub>-ПКЛ с высоким выходом, при этом максимальное содержание тамоксифена в наночастицах составило 43,5% от массы частиц. Изучение наночастиц с тамоксифеном методом динамического светорассеяния показало, что при включении тамоксифена уменьшается радиус частиц и удается получить монодисперсию наночастиц средним размером  $\sim 200 \pm 10$  нм. С помощью ПМР-спектроскопии показано, что использование амфифильного Дек-ПКЛ с повышенным содержанием ПКЛ увеличивает интенсивность пиков протонов тамоксифена, следовательно, тамоксифен лучше сольбилизируется в частицы с более выраженными гидрофобными свойствами. Кроме того, можно сделать вывод, что блоки декстрана осуществляют стерическую защиту гидрофобного поликапролактонового ядра и

препятствуют сольбилизации тамоксифена в наночастицы, образованные Дек<sub>23</sub>-ПКЛ и Дек<sub>33</sub>-ПКЛ.

Кинетику высвобождения тамоксифена из полимерных наночастиц на основе Дек<sub>10</sub>-ПКЛ изучали в 0,05 М фосфатном буфере с 0,5% лаурилсульфата натрия (рис. 7, кривая 4). Начальный «выброс» тамоксифена был связан с высвобождением лекарственного средства у поверхности наночастиц. Высвобождение тамоксифена из наночастиц происходит постепенно и за 72 ч составляет 92%. Этот результат наводит на мысль, что большая часть противоопухолевого вещества локализована в ядре Дек-ПКЛ наночастиц.

Результаты исследования наносистем доставки лекарственных средств на основе Дек-ПКЛ были доложены на четырех международных конференциях и симпозиумах [32—35].

Представленный материал свидетельствует о плодотворности сотрудничества кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ и Факультета Фармации Университета Париж-Юг в области создания и исследования коллоидных систем доставки лекарственных средств, в результате которого был найден ряд целесообразных и эффективных решений для контролируемого введения лекарств.

\*\*\*

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (государственный контракт № 05.512.11.2017) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48747).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И.В., Казанская Н.Ф., Ларионова Н.И. Биохимия, 1970, т. 35, № 5, с. 983—988.
2. Денисенко О.О., Замолодчикова Т.С., Попыкина Н.А., Ларионова Н.И. Биохимия, 2006, т. 71, № 6, с. 815—824.
3. Hamdi G., Ponchel G., Duchêne D. J. Control. Release, 1998, v. 55, № 2—3, p. 193—201.
4. Ларионова Н.В., Казанская Н.Ф., Ларионова Н.И., Поншель Ж., Дюшен Д. Биохимия, 1999, т. 64, № 8, с. 1022—1028.
5. Larionova N.V., Ponchel G., Duchêne D., Larionova N.I. Int. J. Pharm., 1999, v. 189, № 2, p. 171—178.
6. Ларионова Н., Дюшен Д., Белоусова Р. Вестник МГУ, 2000, № 6, с. 417—419.
7. Larionova N., Malykh E., Krasota A., Duchêne D., Ollivon M., Gernet M., Belousova R., Shen W.-C. Sci. Pharm., 2001, v. 69, № 3, p. 302—303.
8. Krasota A., Belousova R., Duchêne D., Larionova N. J. Contr. Release, 2002, v. 75, p. 703—712.
9. Larionova N.V., Malykh E.V., Villemson A.L., Krasota A.Ju., Duchêne D., Ollivon M., Gernet M., Belousova R.V., Shen W.-C., Larionova N.I. Int. J. Pharm., 2003, v. 256, № 1—2, p. 191—198.
10. Larionova N.V., Moroz N.A., Larionova N.I., Hamdi G., Dumistracel D., Duchêne D., Ponchel G. Proc. Symp. «Particulate



- Systems, From Formulation to Production», Istanbul, Turkey, 1997, p. 91—92.
11. Larionova N., Ponchel G., Duchêne D. Proc. 2<sup>nd</sup> World Meeting APGI/AVP, 1998, Paris, France, p. 541—542.
  12. Larionova N., Kazanskaya N., Ponchel G., Duchêne D. Int. Conf. «Biocatalysis-98: Fundamentals and Application», Puschino, Russia, 1998, p. 63.
  13. Larionova N.I., Ponchel G., Duchêne D. Int. Symp. Natural Origin Substances in Drug Formulation, Beijing, China, 1998, p. 53—54.
  14. Larionova N., Tiourina O., Kazanskaya N., Ponchel G., Duchêne D. Proc. 26-th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Boston, USA, 1999, p. 851—852.
  15. Larionova N., Duchêne D., Belousova R. Int. Conf. «Biocatalysis-2000», Moscow, Russia, 2000, p. 117.
  16. Larionova N., Ponchel G., Duchêne D. Proc. 3-rd Meeting APV/APGI, Berlin, Germany, 2000, p. 519—520.
  17. Larionova N., Krasota A., Duchêne D., Belousova R. IX Int. BRG Workshop «Bioencapsulation in Biomedical, Biotechnological and Industrial Applications», Warsaw, Poland, 2001, S.P. 6, p. 92—4.
  18. Larionova N.I., Larionova N.V., Villemson A.L., Kazanskaya N.F., Krasota A.Ju, Belousova R.V., Duchêne D., Ollivon M. Int. Conf. «Biocatalysis-2002: Fundamentals & Applications», Moscow, Russia, 2002, p. 60—61.
  19. Тюрина О.П., Шарф Т.П., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Швец В.И., Ларионова Н.И. Биохимия, 2001, т. 66, с. 419—424.
  20. Балкина А.С., Селищева А.А., Сорокоумова Г.М., Ларионова Н.И. Там же, 2006, т. 71, с. 103—110.
  21. Tiourina O., Sharf T., Balkina A., Ollivon M., Selischeva A., Sorokoumova G., Larionova N. J. Liposome Research, 2003, v. 13, 1 3—4, p. 213—229.
  22. Balkina A.S., Selischeva A.A., Sorokoumova G.M., Ollivon M., Larionova N.I. J. Drug Delivery Sci. Tech., 2006, v. 16, № 4, p. 301—306.
  23. Балкина А.С., Селищева А.А., Ларионова Н.И. Ж. биомед. химии, 2007, в печати.
  24. Ларионова Н.И., Тюрина О.П., Олливон М., Малых Е.В., Виллемсон А.Л., Шен В.-Ш. 5-й Симп. «Химия протео-литических ферментов», Москва, Россия, 2002, с. 29.
  25. Балкина А.С., Селищева А.А., Ларионова Н.И. VI Симп. «Химия протео-литических ферментов», Москва, Россия, 2007, II-28.
  26. Tiourina O., Selischeva A., Ollivon M., Larionova N. 27-th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Paris, France, 2000, # 8011.
  27. Larionova N., Tiourina O., Ollivon M., Selischeva A., Sorokoumova G. 4-th World Meeting on Pharmaceutical Technology, Florence, Italy, 2002, p. 747—748.
  28. Balkina A., Krasota A., Belousova R., Ollivon M., Larionova N. 30-th Ann. Meeting Control. Rel. Society, Glasgow, England, 2003, № 187.
  29. Gref R., Rodrigues J., Couvreur P. Macromolecules, 2002, v. 35, p. 9861—9867.
  30. Виллемсон А.Л., Couvreur P., Gref R., Ларионова Н.И. Высокотемп. соед., Сер. А, 2007, т. 49, 1 6, с. 1056—1064.
  31. Villemson A., Couvreur P., Gillet B., Larionova N., Gref R. J. Drug Delivery Sci. Tech., 2006, v. 16, № 4, p. 307—313.
  32. Villemson A., Couvreur P., Lemarchand C., Larionova N., Gref R. Eur. Conf. Drug Delivery and Pharmaceutical Technology, Sevilla, Spain, 2004, p. 117.
  33. Villemson A.L., Couvreur P., Gref R., Larionova N.I. XII Int. BRG Workshop on Bioencapsulation, Vitoria, Spain, 2004, O 4—2, p. 65—68.
  34. Villemson A., Couvreur P., Gref R., Larionova N. 4-th Int. Postgraduate Research Symposium on Pharmaceutics, Istanbul, Turkey, 2004, p. 15.
  35. Ларионова Н.И., Балабушевич Н.Г., Виллемсон А.Л., Греф Р., Балкина А.С. 4-й Межд. конгр. «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, Россия, 2006, с. 203.