

Ю. М. Краснопольский
А. С. Дудниченко
В. И. Швец

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ:

**БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ
В ФАРМАЦИИ И МЕДИЦИНЕ**

Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ, МОЛОДЕЖИ И СПОРТА
УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«Харьковский политехнический институт»

Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец

**ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ:
БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ В ФАРМАЦИИ И МЕДИЦИНЕ**

Учебное пособие

для студентов (в том числе иностранных)
биотехнологического направления

Утверждено
редакционно-издательским
советом университета,
протокол № 2 от 23.06. 2011 г.

Харьков
НТУ «ХПИ»
2011

УДК 615.012 (075)
ББК 52.6я7
К 78

Рецензенты: *И. С. Гриценко*, д-р хим. наук, проф., Национальный фармацевтический университет;
В. И. Стариков, д-р мед. наук, проф., Государственный медицинский университет

Посібник включає відомості, необхідні при вивченні фармацевтичної біотехнології, зокрема біонанотехнології, принципи дослідження, розробки, виробництва і використання наночасток – ліпосом у фармації та медицині. .

Призначено для студентів біотехнологічного напрямку підготовки.

Краснопольский Ю. М.

К 78 Фармацевтическая биотехнология: Бионанотехнология в фармации и медицине : учеб. пособие / Ю. М. Краснопольский, А. С. Дудниченко, В. И. Швец. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011.– 228 с.– На рус. яз.

ISBN 978-966-593-942-9

Пособие включает сведения, необходимые при изучении фармацевтической биотехнологии, в частности бионанотехнологии, принципы исследования, разработки, производства и использования наночастиц – липосом в фармации и медицине.

Предназначено для студентов биотехнологического направления подготовки.

Ил. 28. Табл. 10. Библиогр.: 90 назв.

УДК 615.012 (075)
ББК 52.6я73

© Ю. М. Краснопольский,
А. С. Дудниченко, В. И. Швец, 2011
© НТУ «ХПИ», 2011

ISBN 978-966-593-942-9

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Глава 1. Наночастицы	7
1.1. Полимерные наночастицы.....	8
1.2. Липосомы.....	11
1.3. Фуллерены.....	12
1.4. Циклодекстрины.....	14
1.5. Наночастицы металлов.....	17
1.6. Альтернативные системы доставки лекарственных препаратов.....	21
1.7. Препараты наночастиц в клинике.....	22
Глава 2. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов	26
2.1. Липидные субстанции.....	39
2.2. Получение липидной пленки.....	41
2.3. Получение липосом.....	42
2.4. Отделение невключенной в липосомы субстанции.....	53
2.5. Стерилизующая фильтрация.....	54
2.6. Разлив препарата и лиофилизация липосом.....	56
2.7. Ресуспендирование липосом.....	72
2.8. Контроль препарата.....	73
Глава 3. Липосомальные формы лекарственных препаратов	80
3.1. Липосомальные формы противоопухолевых препаратов в онкологии.....	80
3.2. Липосомальная форма природного фосфатидилхолина («Липин»).....	118
3.3. Липосомальные формы лекарственных средств, восстанавливающих функции дыхания.....	128
3.4. Липосомальные препараты в офтальмологии.....	137
3.5. Липосомальные формы гормональных препаратов.....	142
3.6. Липосомальная форма амфотерицина В.....	150

3.7. Липосомальные формы противомикробных препаратов.....	156
3.8. Липосомальные формы нейротропных препаратов.....	167
3.9. Липосомальные формы лекарственных препаратов в стоматологии.....	171
3.10. Липосомальные формы лекарственных препаратов в кардиологии.....	174
3.11. Липосомы, содержащие металлы.....	179
3.12. Липосомальные формы препаратов гепарина.....	182
Глава 4. Липосомальные формы адьювантов и вакцин.....	186
4.1. Противовирусные вакцины.....	188
4.2. Антибактериальные вакцины.....	193
4.3. Рибосомальные вакцины.....	199
4.4. Противоопухолевые вакцины.....	202
Заключение	211
Список литературы	220

ВВЕДЕНИЕ

Основной задачей исследования в области фармакологии является разработка безопасных и высокоэффективных лекарственных препаратов. Весь путь создания новых лекарственных препаратов или создания новых форм лекарственных препаратов возможен только при использовании основных достижений фармакологии, биотехнологии, биохимии, фармации и других направлений науки. Многие активные фармацевтические субстанции до сих пор применяют исходя из уверенности в том, что они рано или поздно обязательно достигнут нужной ткани, органа или клетки. Однако, к сожалению, это происходит достаточно редко. В связи с этим становится понятно, что особый интерес исследователей вызывает поиск носителей, способных обеспечить целевую («адресную») доставку лекарственного средства.

Открытие наночастиц различной структуры и возможность их технологического получения создает перспективу в разработке новых оригинальных лекарственных препаратов. Каждое открытие нанобиотехнологии это очередной шаг к созданию новых препаратов отличающихся высокой эффективностью, снижением токсических свойств и направленностью действия. Такой метод в настоящее время получил специальное название «таргетная терапия», исходя из английского термина «target», т.е. мишень. Причем, весьма существенно, что такой мишенью могут быть не только сами патологически измененные клетки, но и отдельные элементы клетки, например, биологические мембраны. Сегодня существуют реальные примеры использования наночастиц как носителей лекарственных веществ: полимерные наночастицы, циклодекстрины, наночастицы металлов, нанодисперсии и искусственные мембраны – липосомы. Из перечисленных наночастиц именно липосомы

максимально привлекают исследователей при разработке новых лекарственных форм.

Липосомальные препараты обладают рядом несомненных преимуществ.

Приведенные в учебном пособии данные подтверждают возможность широкого использования липосомальных форм лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний. За прошедшие годы лекарственные липосомальные препараты успешно используются в онкологии, офтальмологии, кардиологии, лечении и профилактике инфекционных заболеваний и т.д. Крайне важным является способность ряда липосомальных лекарственных препаратов демонстрировать высокую эффективность при лечении резистентных форм заболеваний в сравнении со свободными формами лекарственных препаратов, например, цитостатиков или антибиотиков.

Сегодня данное направление признано приоритетным во многих странах мира с развитой фармацевтической наукой и промышленностью, являясь, по нашему мнению, единственным реальным примером применения нанотехнологий в фармации и медицине.

Необходимо отметить, что Украина является одним из мировых лидеров по производству липосомальных лекарственных форм. Так, например, в Украине зарегистрированы оригинальные липосомальные препараты: «Липин», «Липодокс», «Лиолив» и др.

Технологии, приведенные в данном учебном пособии, являются принципиально возможной схемой получения липосомальных препаратов и не являются технологией конкретного производителя. Попытка их воспроизводства не может закончиться успешно, так как приведены только общие характеристики процессов, позволяющие представить и оценить современное состояние проблемы.

В этом учебном пособии суммированы основные технологии, ключевые проблемы и цели создания различных видов лекарственных и профилактических препаратов на основе нанобиотехнологий.

ГЛАВА 1. НАНОЧАСТИЦЫ

Применение нанотехнологий позволяет расширить арсенал лекарственных средств и значительно повысить эффективность действия активных фармацевтических субстанций. Впервые термин «нанотехнологии» применен Норио Танигучи, инженером Токийского университета в 1974 году в статье, посвященной обработке материалов. Наночастицы для применения в медицине представлены сферическими наноразмерными объектами из биodeградируемого материала, например, белка (альбумина, коллагена), жиров, синтетических полимеров. Размер цельных наночастиц колеблется от 10 до 1000 нм. Это дает возможность использования их для одновременной визуализации поврежденных тканей и направленной доставки лекарственных препаратов.

Создание препаратов на основе наночастиц является одним из перспективных направлений современной нанобиотехнологии. *Наночастицы обладают рядом несомненных преимуществ:*

- ✓ защищают клетки организма от токсического действия лекарственных веществ;
- ✓ пролонгируют действие введенного в организм лекарственного препарата;
- ✓ защищают лекарственные вещества от деградации;
- ✓ способствуют проявлению нацеленной специфичности за счет селективного проникновения из крови в ткани, что приводит к избирательной их концентрации в зоне очага поражения;
- ✓ изменяют фармакокинетику лекарственных препаратов, повышая их фармакологическую эффективность;
- ✓ позволяют создать водорастворимую форму ряда гидрофобных лекарственных субстанций, увеличивая тем самым их биодоступность.

Использование наночастиц для лечения человека позволило создать новое направление в медицине – наномедицину. По определению ведущего специалиста в данном направлении исследований Р. Фрейтаса: «*Наномедицина* – это слежение, исправление, конструирование и контроль над биологи-

ческими системами человека на молекулярном уровне, используя разработанные наноустройства и наноструктуры».

В настоящее время хорошо известен ряд наноструктур: полимерные наночастицы; липосомы; фуллерены; нанодисперсии из масла и воды; циклодекстрины; наночастицы металлов; твердые липидные наночастицы; полимер-протеиновые наночастицы и ряд других. Мы остановимся на основных свойствах наночастиц, использование которых в медицине является наиболее перспективным.

1.1. Полимерные наночастицы

Полимерные наночастицы было предложено использовать в качестве систем доставки в 70-х годах XX века. Исходным материалом для них могут служить различные естественные или биоинертные синтетические полимеры: полисахариды, полимолочная кислота, полилактиды, полиакрилаты, акрил-полимеры.

Под термином «*полимерные наночастицы*» понимают два морфологически различных вида частиц: наносферы и нанокапсулы. *Наносферы* представляют собой сплошные полиморфные матрицы, в которых распределено активное вещество. *Нанокапсулы* состоят из полимерной оболочки, которая охватывает наполненную жидкостью полость. Эти виды наночастиц различаются по высвобождению лекарственных веществ: из наносфер высвобождение протекает по экспоненте, а из нанокапсул – в течение длительного времени (константно). Наибольшее распространение получили натуральные или синтетические полимеры, такие как коллаген, альгинат, хитозан, полимолочная кислота, поликапролактон, полиакрилаты.

Первым синтетическим полимером и биоабсорбирующим материалом была полигликолевая кислота, с открытия которой в 1954 году начато изучение данного класса полимеров. С тех пор и по настоящее время техника доставки лекарственных средств использует полимеры производные от молочной (PLA) и гликолевой кислот (PGA), а также ϵ -капролактама (PCL). Однако наилучшими показателями обладает сополимер PLGA (PLA и PGA). В зависимости от соотношения молочной и гликолевой кислот можно менять некоторые свойства продукта, например, пластичность, плотность, срок биоде-

градации. За эти годы были разработаны противоопухолевые препараты на основе наночастиц сополимеров молочной и гликолевой кислот (PLGA), которые под названием «Золадекс», «Соматулин» разрешены к применению. Сополимер PLGA (50 / 50 Poly (DL-lactide-co-glycolide)) нетоксичен и в организме человека подвергается биодеградации с образованием молочной и гликолевой кислот, катаболизм которых завершается образованием двуокиси углерода и воды.

Широкое распространение получили полилактидные и поли (лактидо-ко-гликолидные) наночастицы. Установлено, что эти наночастицы попадают в клетки путем эндоцитоза. Изменение поверхностного заряда наночастиц, происходящее внутри лизосом в кислой среде, способствует их быстрому высвобождению из лизосом и накоплению в цитоплазме.

Интересным примером улучшения захвата и уменьшения экзоцитоза наночастиц может служить их конъюгация с трансферрином.

Одной из главных проблем при создании пролонгированных форм антибиотиков с использованием наночастиц сополимера молочной и гликолевой кислот PLGA в форме спрея является высокий риск развития эмболии в сосудах легких. В России получены препараты наночастиц гентамицина и антибиотиков цефалоспоринового ряда с использованием техники эмульгирования и оригинальной технологии, позволяющей получить лиофилизованные продукты наночастиц антибактериальных средств различных классов.

Для снижения токсических проявлений наночастиц в их состав вводят D-маннит, поливиниловый спирт в присутствии которых образуется средство: однородное по составу, прозрачное со стабильностью при комнатной температуре свыше 1 года. Одновременно пролонгируется действие препарата время которого увеличивается в 10 раз. При этом препарат обладает высокой эффективностью

Были получены интересные результаты, которые показали, что уровень накопления стерически стабилизированных полиметилметакрилатных наночастиц в экспериментальных опухолях коррелирует с экспрессией эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), который является маркером опухолевого ангиогенеза. Наиболее высокая экспрессия VEGF и, соответственно, наибольшее количество частиц были найдены в подкожно имплантированной

меланоме В-16. С другой стороны, в клетках интрацеребральной глиобластомы U-373 экспрессия VEGF была незначительной; в то же время эта опухоль практически не накапливала частиц.

Повышенная экспрессия рецепторов трансферрина характерна для различных видов опухолей, что обуславливает интерес к этому белку как вектору для направленного транспорта противоопухолевых веществ. Так, например, стелс-наночастицы на основе полиактидов и полиалкилцианоакрилата (ПАЦА), модифицированные трансферрином с помощью авидин-биотинового метода, эффективно доставляли паклитаксел в клетки глиомы и саркомы S-180 мышей. Модификация трансферрином также повысила селективность наночастиц на базе ПЭГ-ПАЦА. При лечении мышинной саркомы S-180 противоопухолевый эффект паклитаксела, связанного с такими частицами, был значительно более выраженным, чем в случае частиц без трансферрина или свободного паклитаксела. На модели рака предстательной железы у мышей было показано, что однократное внутритухоловое введение паклитаксела в составе конъюгированных с трансферрином наночастиц значительно увеличивало продолжительность жизни животных и даже приводило к полной регрессии опухоли. Эффект комплекса наночастиц – трансферрин был значительно более выраженным, чем действие паклитаксела в форме обычных наночастиц или в растворе Кремофора EL.

Предложено использовать наночастицы, которые к клеткам пораженных раком легких доставляют светочувствительные материалы, которые выделяют активный кислород – фотодинамическая терапия. Для создания таких наночастиц использованы биоразлагаемые полимеры, известные как полиакрил-гликолевая кислота.

Перспективными исследованиями является работа российских ученых академика РАМН Швеца В.И. и Гальпериной С.Э, посвященных изучению доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц. Проблема заключается в неэффективном проникновении лекарственных препаратов в мозг, например, при различных видах опухолей. Причиной этого является защитная функция гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Сегодня не существует эффективного лечения наиболее агрессивных первичных злокачественных опухолей мозга – глиобластом. Эти опухоли составляют 60 % всех первичных опухолей головного мозга и 20–25 % опухолей детского воз-

раста. Авторами для исследования были использованы полибутилцианоакрилат (для получения наночастиц) и доксорубин гидрохлорид (в качестве лекарственной субстанции). Полибутилцианоакрилат отличается быстрой деградацией в течение 24 часов; низкой молекулярной массой 3–4 кДа; относительно низкой токсичностью; высокой емкостью и простотой технологии получения. Доксорубин гидрохлорид отличается высокой эффективностью при различных видах опухолей; амфифильностью; не проходит через ГЭБ. Получение наночастиц проводили по следующей схеме: приготовление полимеризационной среды (0,01 N хлористоводородная кислота, 1 % декстран, рН 2,0); прибавление бутилцианоакрилата (1,0 %) и D-маннита (3,0 %); прибавление доксорубина гидрохлорида через 30 минут после прибавления бутилцианоакрилата. Размер полученных наночастиц – 220 ± 40 нм, сорбция доксорубина составляла 60–70 %, содержание антибиотика 0,33 мг доксорубина на мг полибутилцианоакрилата. Наночастицы также были модифицированы полисорбатом-80. Результат химиотерапии животных с перевитой глиобластомой наносомальными формами доксорубина показал, что у 20–40 % крыс наблюдалась длительная ремиссия без признаков роста опухоли в течение 6 месяцев. Также обнаружено снижение токсичности доксорубина, в частности, кардио-, гепато- и тестикулярной токсичности.

1.2. Липосомы

Липосомы представляют собой наноразмерные коллоидные сферы, которые состоят из липидного слоя, окружающего активное лекарственное средство. *Создание и применение липосом* – искусственных сферических мембранных конструкций на основе липидов – *составляет одно из перспективных направлений современной бионанотехнологии*. Липосомы впервые были получены Бенгхемом при исследовании роли фосфолипидов в процессе свертывания крови. Липосомы можно «нагрузить» различными лекарственными средствами, среди которых могут быть витамины, гормоны, ферменты, цитостатики и другие соединения. Введенные в организм липосомы, нагруженные лекарственным средством, взаимодействуют с мембранами клеток, связываются с ними и передают клетке лекарственный препарат. Использование липосом в медицине последние 30 лет нашло широкое применение, как

в лечебных, так и в диагностических целях. *Липосомальные препараты обладают рядом преимуществ:*

- ✓ пролонгируют действие введенного в организм лекарственного препарата;
- ✓ изменяют фармакокинетику лекарственных препаратов, существенно повышая их фармакологическую эффективность;
- ✓ защищают лекарственные вещества от деградации;
- ✓ защищают здоровые клетки и патологические органы от токсического действия лекарственных препаратов;
- ✓ способны увеличивать биодоступность лекарственных субстанций.

Необходимо также отметить высокую эффективность липосом при использовании их в качестве адъювантов составе вакцин. Липосомальные формы лекарственных препаратов являются единственным реальным примером применения нанопрепаратов в медицине. На этой группе препаратов мы остановимся в следующих главах учебного пособия.

1.3. Фуллерены

Фуллерены – это наночастицы на основе углерода. В 1990 году Вольфганг Кретчмер и Дональд Хаффман описали метод получения фуллеренов испарением графитовых электродов в электрической дуге в атмосфере гелия. Таким образом, *фуллерены являются четвертой аллотропной формой углерода*. Наиболее изученные фуллерены состоят из 60 и 70 атомов углерода (C_{60} и C_{70}) и представляют собой частицы сферической формы. Диаметр таких частиц около 0,7 нм. На рис. 1 показана шаростержневая модель молекулы фуллерена-60 и его проекционная формула. Нанотрубки по форме напоминают цилиндр, причем их длина может в тысячи раз превышать диаметр, который около 0,7 нм. Присоединение к C_{60} радикалов, содержащих металлы платиновой группы, позволяет получить ферромагнитные материалы на основе фуллерена. Имеются сообщения о внедрении атомов лантана, никеля, натрия, калия, рубидия, цезия, а также атомов редкоземельных элементов, таких как тербий и гадолиний. Сами по себе углеродные фуллерены как сильные окислители обладают цитотоксичностью, связанной с индукцией перекисного окисления липидов. Использование химической модификации, например, включение гидроксильных или N-этиламино-групп, позволяет увеличить биосовместимость фуллеренов. По мнению авторов наноразмеры

фуллеренов и возможность присоединения к ним лекарственных препаратов и других лигандов, придающих органотропность, делают фуллерены весьма привлекательными для разработки нового типа лекарственных средств. Ингибируя уровень радикалов кислорода, фуллерены могут оказаться весьма эффективными для лечения, например, аллергических заболеваний. Фуллерены могут стать основой не только для систем доставки, но и для создания нового класса лекарственных препаратов. На их основе разрабатываются препараты для лечения инфицированных вирусом иммунодефицита человека и онкологических больных. Обсуждается идея создания противораковых препаратов на основе водорастворимых эндоэдральных соединений фуллеренов (это молекулы фуллеренов, внутри которых помещен один или более атомов какого-либо элемента) с радиоактивными изотопами или соединениями для нейтронозахватной терапии (бор, висмут, гадолиний). Предложены методы синтеза противораковых, противовирусных (вирус гриппа) препаратов, а также препаратов для лечения остеопороза, заболеваний сосудов на основе фуллеренов.

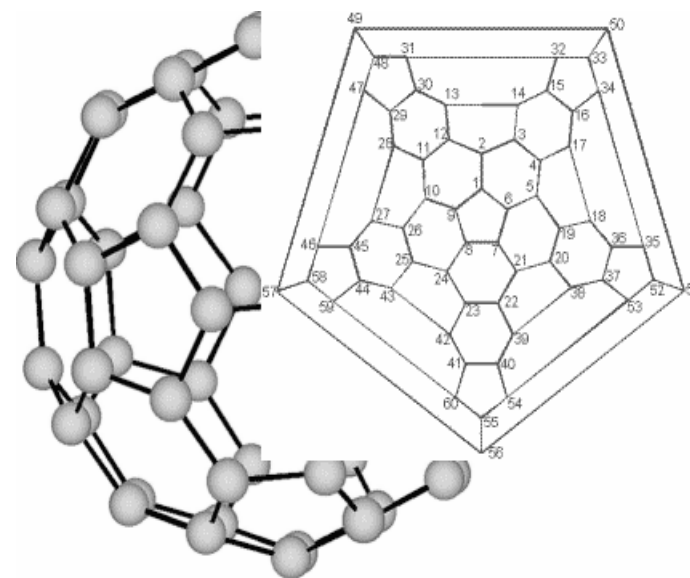


Рисунок 1 – Шаростержневая модель молекулы фуллерена-60 и его проекционная формула

1.4. Циклодекстрины

Циклодекстрины являются энзимо-модифицированными производными крахмала, которые уже давно выпускаются в промышленных масштабах и более двадцати лет широко используются в фармацевтической, пищевой и других отраслях промышленности. Они, в основном, включают семейство из трех, хорошо известных и промышленно выпускаемых крупных олигосахаридов, а также несколько более мелких. Три крупных природных циклодекстрина представляют собой кристаллические, гомогенные и негигроскопические субстанции. Их тороидальные макрокольца построены из глюкопиранозы, скрепленной α -1,4-гликозидными связями.

Цикломальтогексоза (α -циклодекстрин) содержит шесть таких блоков; цикломальтогептаоза β -циклодекстрин) содержит семь блоков; цикломальтооктаоза (γ -циклодекстрин) – восемь блоков. Начало исследований циклодекстринов было начато в 1891 году французским ученым А. Виллерсом и достаточно интенсивно продолжается в настоящее время.

Циклодекстрины нетоксичны. Форма кристаллов хорошо различима при небольших увеличениях и специфична для каждой из разновидностей гомологов. Количество кристаллизационной воды в различных препаратах циклодекстринов варьирует от 8 до 18 %, в зависимости от методов их получения, режимов сушки и кристаллизации. В основе структуры циклодекстринов находятся звенья глюкопиранозных колец, образующие лентообразную круговую структуру. Первичные гидроксильные группы шестого углеродного атома глюкопиранозы (C_6) равномерно сосредоточены с узкой стороны молекул циклодекстринов, вторичные (C_2 и C_3) с более широкой. Гидрофобная поверхность внутренней части кольца, в значительной части «выложена» водородными атомами H_3 и H_5 , непосредственно связанными с атомами углерода, что, в основном, и является причиной отсутствия полярности полости. Считается, что форма молекул циклодекстринов близка к тору, по определению представляющему собой геометрическое тело, образованное вращением круга вокруг некоей прямой, лежащей в плоскости круга, но не пересекающей его. На рис. 2 даны структурные формулы циклодекстринов и компьютерные модели их молекул.

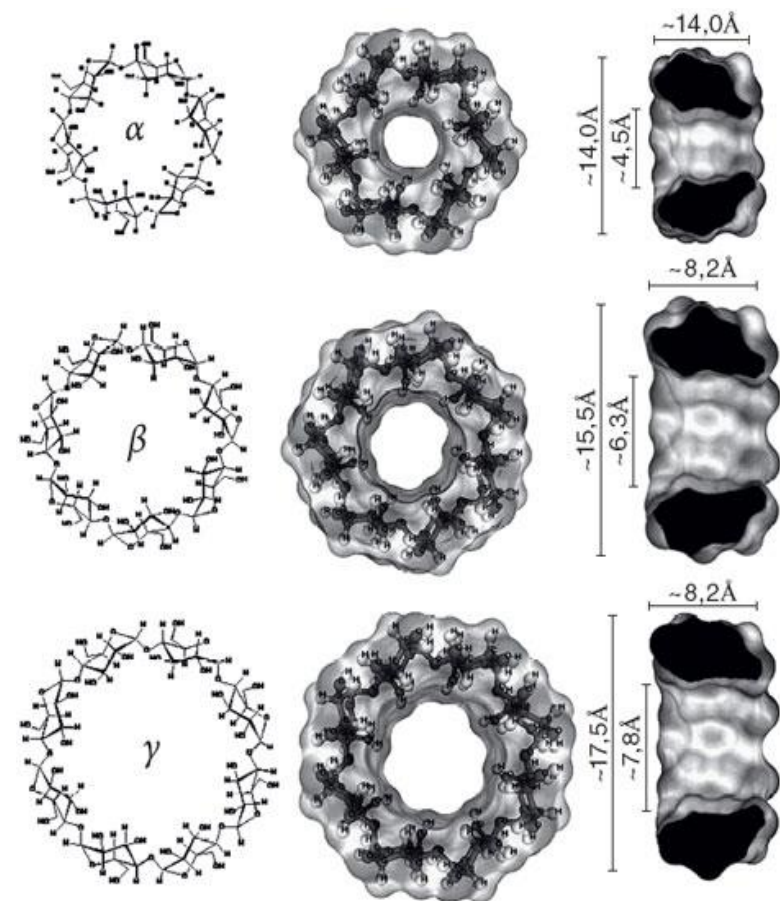


Рисунок 2 – Структурные формулы циклодекстринов и компьютерные модели их молекул (по И.М.Грачевой, 2006 г)

Характеристика циклодекстринов (ЦД) приведена в табл. 1.

Таблица 1 – Основные характеристики α -, β - и γ -циклодекстринов.

Параметр	α -ЦД	β -ЦД	γ -ЦД
Число глюкозных остатков в цикле	6	7	8
Молекулярная Масса	972	1135	1297
Диаметр полости, Å	4,7–5,3	6,0–6,5	7,5–8,3
Высота тора, Å	$7,9 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$
Объем внутренней полости, Å ³	174	262	472
Диаметр тора по периферии, Å	$14,6 \pm 0,4$	$15,4 \pm 0,4$	$17,5 \pm 0,4$
Оптическое вращение, D ²⁵	$150,0 \pm 5$	$162,5 \pm 0,5$	$177,4 \pm 0,5$
Растворимость в воде, г на 100 мл	14,5	18,5	23,2
Формы кристаллов при кристаллизации из воды	Гексагональные пластинки	Моноклинные параллелограммы	Квадратные призмы

Весьма перспективной представляется область применения, связанная с получением комплексов циклодекстринов и ряда фармацевтических препаратов. При этом удастся достичь пролонгации действия фармацевтической субстанции, повысить её растворимость, значительно уменьшить токсическое действие лекарственного препарата. Например, β -циклодекстрины улучшают биодоступность лекарства в глазных каплях. В наночастицы из циклодекстринов включали противотуберкулезные препараты (рифампицин, изониазид и др.), включение составляет от 40 до 70 % в зависимости от состава и вида лекарства, размер от 86 до 290 нм. Наночастицы, полученные при конъюгировании β -циклодекстринов и антрациклинового антибиотика доксорубина гидрохлорида обладали меньшей кардиотоксичностью большими значениями LD₅₀ по сравнению со свободной формой антибиотика. Перспективным является использование циклодекстринов для образования комплексов с гидрофобными витаминами группы А, D, Е, которые обычно применяются лишь в форме масляных растворов.

1.5. Наночастицы металлов

Проведенные в последние годы исследования по созданию и изучению новых наночастиц доказали перспективность использования наночастиц металлов: железа, золота, кремния, кальция и ряда других.

Наличие у *наночастиц оксида железа* парамагнитных и суперпарамагнитных свойств оказалось эффективным при их использовании в качестве магнитрезонансных контрастных средств при проведении магнитрезонансной томографии, используемой для диагностики широкого спектра заболеваний внутренних органов. Препараты наночастиц железа относятся к тканеспецифическим магнитрезонансным контрастным средствам, имея тропность к ретикулоэндотелиальной системе (РЭС) и позволяют контрастировать печень, селезенку и костный мозг. Наночастицы Fe₂O₃ улучшают визуализацию диффузных и очаговых поражений селезенки, а также позволяют дифференцировать лимфатические узлы с метастазами от нормальных. Частицы железа обеспечивают получение ценной диагностической информации при злокачественных опухолях печени, а также при наличии гемангиом, кист, узловых гиперплазий. Чувствительность метода составляет 93,8 %, а специфичность – 91,5 %. Исследования проведены на 900 больных с очаговыми поражениями печени. Наночастицы суперпарамагнитного оксида железа с размером 20 нм помогают выявлять ишемические поражения головного мозга на ранних стадиях, идентифицировать участки ишемии миокарда, оценивать функцию почек и их гемодинамику. После деградации Fe₂O₃ в системе РЭС атомы железа включаются в состав гемоглобина эритроцитов.

Наночастицы оксида железа заключают в капсулу из полисахаридов, что позволяет им легко проникать в клетки легких, пораженных раком. Прибор, генерирующий магнитное поле заставляет частицы вращаться, вырабатывая тепло. В результате нагрева до 42 °С опухолевая клетка-мишень разрушается, а окружающие ткани остаются нетронутыми.

Наночастицы магнетита Fe₃O₄ (FeO x Fe₂O₃), а также системы, в которых магнитные наночастицы распределены в немагнитной среде также представляют интерес для современной медицины и фармакологии при разработке методов лечения и диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических. Данные методики основаны на использовании специфиче-

ских свойств материалов в наноразмерном состоянии. Особый интерес представляют наночастицы, размер которых соизмерим с размером магнитного домена, так как в этом случае они обладают суперпарамагнитными свойствами. Наночастицы магнетита должны образовывать устойчивую коллоидную систему, удовлетворяющую требованиям биосовместимости и имеющие фиксированное физиологическое значение рН. В ряде случаев получение наночастиц магнетита осуществляют с помощью реакции Элмора. Для стабилизации наночастиц используют лимонную кислоту (не обладает сильными поверхностно-активными свойствами, но приемлема с биологической точки зрения) и цитрат натрия. Получены наночастицы с размером 8,2 нм. Установлено, что цитотоксичность наночастиц снижается при увеличении их оболочки за счет цитрата натрия. Наночастицы магнетита позволяют изменять времена релаксации протонов, и тем самым, контрастировать опухолевые образования и одновременно проводить магнитную гипертермию.

Самостоятельным вопросом использования наночастиц металла является *применение наночастиц коллоидного золота*. Основоположником систематического научного изучения синтеза и физико-химических свойств коллоидного золота можно считать М. Фарадея (1857 г.). В XX веке были достигнуты определенные успехи в лечении ревматоидного артрита солями золота и в терапии онкозаболеваний при использовании растворов изотопа ^{198}Au . Новая эра в использовании коллоидного золота в биологии и медицине открылась работой Г. Френса (1973 г), посвященной методам синтеза коллоидного золота с определенным заранее заданным размером частиц.

Большинство применяемых ингибиторов ангиогенеза – антитела к фактору роста эндотелия сосудов VEGF, молекулы которого стимулируют образование эндотелия в растущих кровеносных сосудах. Наночастицы золота блокируют функцию VEGF, не оказывая токсического действия на клетки.

Применение плазмонно-резонансных золотых наночастиц в биомедицине имеет два основных аспекта: биоспецифическое «нацеливание» на определенные ткани или клетки и оптический плазмонный резонанс. Оптический плазмонный резонанс обусловлен когерентными колебаниями свободных электронов металла под действием электрической компоненты световой волны. Эти колебания приводят к увеличению рассеяния и поглощения света на резонансных длинах волн, обусловленных мультипольностью тензора по-

ляризуемости. При воздействии лазерным излучением с длиной волны, соответствующей пику поглощения наночастиц, можно достичь локального нагрева наночастиц и окружающих их клеток или локализованного выделения инкапсулированного лекарственного вещества.

К наночастицам из золота прикрепляли противоопухолевые препараты. Были собраны 8000 наночастиц, диаметр которых составлял 13 нм. Этот комплекс наночастиц вводили непосредственно в опухоль поджелудочной железы (наноэмболизация). Это позволило в 55 раз увеличить количество наночастиц в ткани по сравнению с внутривенным введением. Причем инъекции с помощью катетера уменьшают побочное действие препарата и увеличивают эффективность лечения рака поджелудочной железы.

Хотелось бы привести достаточно простой способ получения наночастиц золота, предложенный американскими специалистами. Методика получения наночастиц золота состоит в следующем: листья черного чая (100 мг) помещают в стакан емкостью 10 мл и добавляют 6 мл воды и 100 мкл 0,1 М водного раствора соли NaAuCl_4 . Уже через 30 минут при постоянном перемешивании при температуре 25 °С были получены золотые наночастицы сферической формы с размером 15–45 нм. Частицы отделяли от чая фильтрацией через фильтр с размером пор 5 мкм. Методика получила название «зеленый способ».

Исследователи обнаружили, что наночастицы золота имеют на 600 % больше сродства (т.е. связывания) с раковыми клетками, чем со здоровыми. Лучше всего работали частицы с размером 35 нм. Этот эффект можно использовать для диагностики опухолевых заболеваний. Даже при использовании обычного светового микроскопа было хорошо видно, что раковые клетки покрыты наночастицами золота. Кроме того, указанные наночастицы золота, полученные «зеленым способом» легко проникают в опухолевые ткани при раке предстательной железы и раке молочной железы.

Применение наночастиц коллоидного золота позволяет также уменьшить количество используемого цитостатика. Так, например, показано, что цитостатическая активность проспидина, иммобилизованного на частицах коллоидного золота со средним диаметром 25 нм, остается на том же уровне, что и для инъекционной формы проспидина, при значительном уменьшении количества цитостатика.

Существенный прогресс был достигнут в применении лазерного излучения для удаленного вскрытия микрокапсул. Оптическое излучение может быть использовано для терапевтических и диагностических целей благодаря избирательному взаимодействию с оболочками микроконтейнеров. В настоящее время в качестве компонентов оболочки микроконтейнеров с целью придания ей чувствительности к лазерному излучению используют различные красители или металлические наночастицы на основе благородных металлов (Au, Ag). Было установлено, что золотые наночастицы, находящиеся в оболочке микрокапсулы, взаимодействуют с лазерным излучением. Это взаимодействие приводит к изменению проницаемости оболочки или к её разрушению. При этом происходит высвобождение инкапсулированного в контейнеры материала.

Американские ученые установили, что *наночастицы кремния* в диаметре около 20 нм накапливаются в костном мозге и покрытие их несколькими слоями пигмента (меланина) уменьшает побочные эффекты лучевой терапии злокачественных опухолей. После облучения уровень лейкоцитов и тромбоцитов в крови животных, получивших инъекции таких наночастиц снизился на 10 %, тогда как у остальных животных на 60 %.

Нельзя не отметить и данных о *негативном действии наночастиц металлов*. Так, например, появились сообщения о побочном действии наночастиц окиси титана. Наночастицы окиси титана (TiO₂) содержатся в витаминах, пищевых красителях, зубной пасте и сотне других продуктов. Выпуск мировой промышленностью этого продукта весьма значителен (до 2 миллионов тонн). Установлено, что наночастицы диоксида титана приводят к разрыву одно- и двухцепочечных ДНК, что в свою очередь сопровождается накоплением наночастиц в различных органах и повреждением хромосом. Так, например, у мышей, которым давали воду с TiO₂ уже на 5-ый день появились признаки генетических повреждений.

Однако, наночастицы металлов в настоящее время имеют значительные перспективы использования в составе лекарственных и диагностических препаратов при ряде заболеваний человека.

1.6. Альтернативные системы доставки лекарственных препаратов

Поиск альтернативных систем доставки лекарственных препаратов продолжается.

Полимер-протеиновые наночастицы. Большое значение имеют системы доставки препаратов на основе протеинов, действие которых зачастую снижается из-за ограниченного времени нахождения в крови, химической лабильности и способности приводить к иммунному ответу на белок. Благодаря присоединению к белку полимерной цепочки удастся не только увеличить период их полураспада в крови, но и повысить их фармакологическую эффективность. Сегодня известны два препарата, представляющие собой *полимер-протеиновые конъюгаты*: Пегасис (Pegasys – пэгилированный 2α-интерферон) для лечения гепатита С и Нейласта (Neulasta – пэгилированный hG-CSF) для терапии нейтропении.

Твердые липидные наночастицы (Solid lipid nanoparticles, SLN). Система SLN представляет собой водную коллоидную дисперсию наночастиц (50–1000 нм), состоящих из биodeградируемых липидов (как правило, восков или глицеридов) и активного лекарственного компонента.

Наночастицы биополимеров. Липополисахарид (ЛПС) обнаруживается у грамотрицательных микроорганизмов – амфифильный биополимер, локализованный на внешней поверхности бактериальных клеток, обуславливает мощное положительное и отрицательное воздействие на организм. ЛПС *in vitro* и *in vivo* спонтанно образует многослойные наноструктуры (мицеллы) размером 70–100 нм. ЛПС обладает важными свойствами, усиливая синтез иммуноглобулинов и синтез противовоспалительных цитокинов. Возможно создание антибактериальных вакцин, иммуностимуляторов и иммунотропных препаратов. Однако ЛПС даже в нанogramмовых количествах мощный эндотоксин (пироген), что не дает возможности его использования. Эндотоксические свойства ЛПС аккумулированы в липидном домене (липиде А.) Препараты ЛПС со структурными изменениями липида А обладают эндотоксическими свойствами, не превышающими у коммерческих полисахаридных вакцин. Параметр эндотоксичности (пирогенности) коррелировал с величи-

ной размера мицеллы, образуемой при самосборке полимерных молекул модифицированного ЛПС. Так диаметр наночастиц (мицелл апирогенных образцов модифицированного ЛПС) не превышал 5–10 нм. Создание вакцин на основе модифицированного ЛПС и их контроль на лабораторных экспериментальных животных (мыши, кролики, морские свинки) установил высокие протективные свойства против ряда дизентерийных бактерий: *Shigella* и *flexneri Shigella sonnei*.

1.7. Препараты наночастиц в клинике

Одним из первых нанопрепаратов, доставка которого проводится наночастицами, стал одобренный для клинического использования в США в 2000 году Рапамун (сиролимус) – иммунодепрессант, применяемый для профилактики отторжения трансплантата, например, при трансплантации почек. Сиролимус – антибиотик (относится к группе макролидов), продуцируемый *Streptomyces hydroscopicus*. Препарат получают измельчением активной субстанции в воде, содержащий стабилизаторы (полисорбат-80, фосфатидилхолин, жирные кислоты, пропиленгликоль). Наночастицы Рапамуна варьируют от 80 до 400 нм. Несколько лет назад была создана технология стабилизированных альбумином наночастиц паклитаксела (AB1-007), которая позволила преодолеть низкую растворимость паклитаксела в воде. Исходной посылкой для создания этой рецептуры было желание избавиться от использования высокотоксичного растворителя для паклитаксела – Кремофора EL.

Для устойчивых к действию лекарств клеток (резистентных) характерен повышенный уровень экспрессии специфических трансмембранных белков, известных под названием *ABC-транспортёры*. Полагают, что основным фактором множественной лекарственной устойчивости при онкологических заболеваниях, является один из ABC-транспортёров, а именно Р-гликопротеин (от англ. *Permeability* – проницаемость, *P-gp*). Многочисленные исследования свидетельствуют о возможности повышения эффективности химиотерапии резистентных опухолей при помощи конкурентных ингиби-

торов *P-gp*. Однако, этот подход не нашел применения ввиду высокой сопутствующей токсичности используемых агентов.

Многие потенциально эффективные лекарственные вещества, предназначенные для лечения заболеваний центральной нервной системы, проявляют высокую активность *in vitro*, однако оказываются неэффективными при введении в организм, поскольку поступлению этих веществ в мозг в терапевтических концентрациях препятствует гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). *Проникновение через ГЭБ является необходимым условием* лекарственной активности при опухолях мозга, ишемических инсультах, болезни Альцгеймера или Паркинсона. Сегодня около 95 % используемых лекарств, даже в молекулярной форме и размерах, не могут гарантировать соответствие указанному выше требованию. Их приходится вводить непосредственно в ткани мозга или спинномозговую жидкость путем инъекции либо высвобождения из имплантируемых контейнерных устройств. Разработка безопасных и не инвазивных методов доставки лекарственных препаратов в мозг представляет собой серьезную проблему, для решения которой нужны новые стратегии.

Перспективным направлением исследований является разработка систем доставки, включающих наночастицы различного состава и структуры. Так в опытах на лабораторных животных было показано, что доставку в мозг лекарственных препаратов, не способных преодолевать ГЭБ, можно осуществить, например, с помощью ПАЦА-наночастиц, поверхность которых модифицирована полисорбатом-80. С помощью этих носителей удалось доставить в мозг гексапептид даларгин и тубокурарин – вещества которые, являясь субстратами *P-gp*, не способны преодолевать ГЭБ. Факт доставки этих веществ в мозг с помощью наночастиц был доказан путем фармакологических тестов, демонстрирующих действие наносомных форм, в то время как свободные вещества такого действия не оказывали. Эти результаты послужили основанием для создания совершенно новой концепции, согласно которой наночастицы могут служить средством доставки в мозг веществ, которые в свободном виде не способны преодолевать ГЭБ. Практическая значимость этой концепции была наиболее убедительно продемонстрирована на

примере доксорубина. Являясь субстратом *P-gp*, доксорубин при системном введении практически не способен проникать в мозг. В то же время ряд фактов свидетельствует о том, что эффективность доксорубина при лечении опухолей мозга определяется возможностью его доставки в мозг в терапевтических концентрациях. Действительно, связывание доксорубина с ПАЦА-наночастицами, модифицированными полисорбатом-80, привело к значительному повышению его концентрации в мозге при внутривенном введении здоровым крысам и обеспечило высокий противоопухолевый эффект в отношении глиобластомы. Аналогично было показано, что инкапсулирование доксорубина в липосомы также приводило к преодолению ГЭБ.

Также примером практического успеха в создании лекарственных препаратов на основе наночастиц является фирма NanoMed Pharmaceutical (США), сосредоточившая свои усилия на средствах доставки лекарственных препаратов непосредственно в головной мозг. Изготовленные из приемлемых материалов (например, длинноцепочечных спиртов, фосфолипидов или ПАВ), наночастицы имеют активную ионную поверхность, в которую включены различные молекулы. Специалистам фирмы NanoMed Pharmaceutical удалось решить проблему и создать наночастицы, которые успешно преодолевают ГЭБ, причем, обеспечивают адресную доставку препарата без существенного отрицательного воздействия на здоровые клетки головного мозга. Понятно, что отсюда следует реальная возможность уменьшения терапевтической дозы, частоты введения и т.д. Ранее, при опухолях головного мозга, из-за ограничения проникновения через ГЭБ вводили в повышенных дозах препарат «Паклитаксел». Изготовленный в форме наночастиц препарат на полимерной матрице позволяет решать эти вопросы.

В заключении хочется сказать, что приведенные выше данные подтверждают *возможность применения наночастиц в медицинской практике*. Интерес к нанотехнологиям в фармакологии обусловлен не наноразмерами частиц, а прежде всего возможностью получения новых высокоэффективных лекарственных препаратов, в которых наночастицы содержат активные фармацевтические субстанции. Сегодня это направление признано приоритетным во многих странах мира с развитой фармацевтической наукой и промышлен-

ностью. В то же время, наиболее активно в практической медицине используются лекарственные препараты на основе наночастиц – липосом, являясь единственным реальным примером применения нанотехнологий в медицине. Липосомы являются эффективными наноконтейнерами для доставки лекарственных препаратов. В последующих главах нами будут рассмотрены технологические аспекты получения липосом и возможности использования этих наночастиц в различных направлениях медицины.

Контрольные вопросы

1. Привести классификацию основных типов наночастиц, используемых в фармации и медицине.
2. Объяснить преимущества наночастиц в медицине, фармации и биотехнологии.
3. Указать, что представляют собой полимерные наночастицы, их состав и перспективы использования в медицине.
4. Описать преимущества липосомальных наночастиц в составе лекарственных средств.
5. Объяснить преимущества использования наночастиц в преодолении гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).
6. Описать конкретные примеры использования наночастиц в медицине.
7. Какая роль Р-гликопротеина в механизме лекарственной устойчивости и её преодоление при использовании наночастиц? Привести примеры.
8. Привести характеристику наночастиц металлов, метод их получения и описать возможность их использования в фармации.
9. Привести характеристику циклодекстринов и описать их основные свойства.

ГЛАВА 2. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Основное свойство фосфолипидов как природных биологически активных веществ – бифильность, определяющая многообразие образуемых ими структур в водных дисперсиях и, в частности, образование протяженных бислоев – основы биологических и модельных мембран – липосом. *Создание и применение липосом* (искусственных сферических мембранных конструкций на основе липидов) *составляет одно из перспективных направлений современной бионанотехнологии*. Липосомы впервые были получены Бенгхемом при исследовании роли фосфолипидов в процессе свертывания крови. Липосомы можно «нагрузить» различными лекарственными средствами, среди которых могут быть витамины, гормоны, ферменты, цитостатики и другие соединения. Введенные в организм липосомы, нагруженные лекарственным средством, взаимодействуют с мембранами клеток, связываются с ними и передают клетке лекарственный препарат. Использование липосом в медицине за последние 30 лет нашло широкое применение, как в лечебных, так и в диагностических целях.

Липосомальные препараты обладают рядом преимуществ:

- ✓ пролонгируют действие введенного в организм лекарственного препарата;
- ✓ изменяют фармакокинетику лекарственных препаратов, существенно повышая их фармакологическую эффективность;
- ✓ защищают лекарственные вещества от деградации;
- ✓ защищают здоровые клетки и патологические органы от токсического действия лекарственных препаратов;
- ✓ способны увеличивать биодоступность лекарственных субстанций.

Необходимо также отметить высокую эффективность липосом при использовании их в качестве адъювантов составе вакцин.

В настоящее время мировой фармацевтической промышленностью разработаны, производятся и выведены на рынок уже более 30 липосомальных препаратов направленного действия (см. табл. 2).

Таблица 2 – Разработанные липосомальные формы лекарственных препаратов

Наименование препарата, метод введения	Компания производитель	Лекарственная субстанция	Основное фармакологическое действие	Стадия изучения
1	2	3	4	5
AmBisone, в/в	NeXstar Pharmaceuticals, США	Амфотерицин В	Противогрибковое	Коммерческий препарат
Daune-Home ,в/в		Доксорубин	Противоопухолевое	Коммерческий препарат
Vinca-Home, в/в		Винкристин	Противоопухолевое	1–2 фаза
MiKasome, в/в		Амикосин	Антибактериальное	2–3 фаза
Doxil, в/в	Alza Pharmaceuticals, США	Доксорубин	Противоопухолевое	Коммерческий препарат
Amphocil Amphotec, в/в		Амфотерицин В	Противогрибковое	Коммерческий препарат
Cuelyx, в/в	Schering-Plough, Бельгия	Доксорубин	Противоопухолевое	Коммерческий препарат
Myocet, в/в	Elan Pharma, США	Доксорубин	Противоопухолевое	Коммерческий препарат
Ampholip, в/в		Амфотерицин В	Противогрибковое	Коммерческий препарат
Липин, в/в	Биолек, Харьков, Украина	Фосфатидил-холин	Антигипоксическое, антиоксидантное, мембранопротекторное	Коммерческий препарат
Липодокс, в/в		Доксорубин	Противоопухолевое	Коммерческий препарат
Лиолив, в/в		Антраль	Гепатопротекторное	Коммерческий препарат
Липофлавон, в/в		Кверцетин	Кардиопротекторное, антиоксидантное	Коммерческий препарат
Липофлавон, глазные капли		Кверцетин	Ранозаживляющее, ангиопротекторное, противовоспалительное	Коммерческий препарат

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Липоплат, в/в		Цисплатин	Противоопухолевое	Закончены клинические испытания
Липотакс, в/в		Доцетаксел	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Visudyn, в/в	Novartis ma, Франция	Вертепорфирин	Для фотодинамической терапии	Коммерческий препарат
Abelcet, в/в	Liposome rpany, США	Амфотерицин В	Противогрибковое	Коммерческий препарат
Evacet, в/в	Liposome Company, США	Доксорубин	Противоопухолевое	3 фаза
Eраxol-Berna Vaccine, в/м	Swiss Serum Vaccine Institute, Швейцария	Антиген гепатита А	Противовирусное	Коммерческий препарат
Inflexal virosomal Influenza Vaccine, в/м		Гемагглютинин, нейраминидаза	Противовирусное	Коммерческий препарат
НераХen Combintd vaccine, в/м	Lipoxen	Антиген гепатита В	Противовирусное	Коммерческий препарат
Diphtheria /Tetanus/ Hepatitis – А vaccine, в/м		Дифтерийный и столбнячный анатоксины, антиген гепатита А	Противовирусное, антибактериальное	1 – 2 фаза
Hepatit А / В Tetanus Diphtheria vaccine, в/м		Дифтерийный и столбнячный анатоксины, антигены гепатита А и В	Противовирусное антибактериальное	1 – 2 фаза
Lipovaca Influenzal Vaccine, в/м	Болгария	Гемагглютинин и нейраминидаза	Противовирусное	Коммерческий препарат
Nyotron, в/в	Aronex Hnarmaceuticals, США	Нистатин	Противогрибковое	2 – 3 фаза

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Atragen, в/в		Ретиноевая кислота	Противоопухолевое	2 – 3 фаза
<i>E.coli</i> 0157: Н7 vaccine, орально	Novovax Inc., США	<i>E.Coli</i> 0157: Н7, антиген	Антибактериальное	1 фаза
Sh. Flexneri 2A vaccine, орально		Sh.Flexneri 2A, антиген	Антибактериальное	1 фаза
Tears again, аэрозоль		Природные фосфолипиды	При синдроме сухого глаза	Коммерческий препарат
Taxosomes, в/в	Aphios corporation, США	Паклитаксел	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Camposomes, в/в		Кампотecin	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
LE-M, в/в	NeoPharm, США	Митоксантрон	Противоопухолевое	1 – 2 фаза
LE-P, в/в		Паклитаксел	Противоопухолевое	1 – 2 фаза
LE-SN38, в/в		Метаболит иринотекана	Противоопухолевое	1 – 2 фаза
SPI-077, в/в	Alza Pharmaceuticals, США	Цисплатин	Противоопухолевое	1 – 2 фаза
SPI-077-B-103, в/в		Цисплатин	Противоопухолевое	1 фаза
SPI-119, в/в		СД-4	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
VSLI onco TCS, в/в	Nana Bioscients, Inc.	Винкристин	Противоопухолевое	2 фаза
Invivac virosomal Influenza vaccine, в/м	Solvay	Поверхностный антиген гриппа	Противовирусное	Коммерческий препарат
Липоферон, внутрь	Jadran	Интерферон альфа	Противовирусное	Коммерческий препарат
EndoTAG-1	MediGene AG, Германия	Паклитаксел	Противоопухолевое	3 фаза

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Доцетаксел		Доцетаксел	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Иринотекан		Иринотекан	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Камптотецин		Камптотецин	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Метотрексат		Метотрексат	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Цисплатин		Цисплатин	Противоопухолевое	Доклиническое изучение
Aroplatin	Antigenics Ins., США	Цисплатин	Противоопухолевое	2-3 фаза
ThermaDox	Gelsion, США	Доксорубин	Противоопухолевое	1-2 фаза
Lipoplatin	Regulon Inc., США	Цисплатин	Противоопухолевое	3 фаза
Lipoxal		Оксалиплатин	Противоопухолевое	2 фаза
Мераст	IDM Pharma, США	Мурамил трипептид	Иммуноадьювантное при химиотерапии	Коммерческий препарат
DepoCyt	Enzon Pharmaceutical Inc., США	Цитарабин	Противоопухолевое	Коммерческий препарат
Нанокорт	Galapagos, Бельгия	Преднизолон	Лечение ревматоидного артрита, рассеянного склероза	3 фаза 2 фаза
Липосом-форте Трикортин-1000	Fidia Farmaceutical, SPA, Италия	Фосфолипиды нервной ткани	Нейротропное средство	Коммерческий препарат
LipoHer Виатромб	Польша Фабрил Фарма, Германия	Гепарин	Антикоагулянтное, противоотечное	Коммерческий препарат
Fluidosomes	Axentis Pharma, Швейцария	Тобрамицин	Антибактериальное	Коммерческий препарат

В ходе работ по созданию лекарственных липосомальных препаратов авторами данной работы и их коллегами накоплен определенный опыт по разработке и промышленному производству липосомальных препаратов. По нашему мнению данные препараты могут быть конкурентно способны на мировом фармацевтическом рынке. Оригинальность состава и технологии, высокая фармакологическая эффективность и низкая токсичность дают основание предположить, что создание условий производства, отвечающего требованиям GMP, даст возможность вывести указанную группу липосомальных препаратов на мировой фармацевтический рынок. Перспективность этих препаратов вполне очевидна, имеются реальные экономические обоснования для их внедрения, например, для противоопухолевого препарата «Липодокса». Соответствие стандартам GMP является необходимым условием для «пропуска» продукции отечественной промышленности на мировые фармацевтические рынки. В настоящей работе рассмотрены основные аспекты технологии при получении липосомальных лекарственных форм в условиях производства, отвечающие требованиям GMP и требующие проведения валидации при разработке каждой стадии технологического процесса.

В течение последних 30 лет нами проводятся разноплановые исследования по созданию различных препаратов на основе фосфо- и гликолипидов.

Исследования ведутся по трем направлениям:

- создание сырьевой базы, позволяющей получать фосфолипиды и гликолипиды высокой степени очистки;
- изучение зависимости биологической активности липидов от их структуры и состава, и на основе полученных данных создание лекарственных и диагностических препаратов;
- решение технологических задач по созданию липосомальных форм препаратов.

В настоящей главе мы остановимся на рассмотрении технологических аспектов получения липосомальных препаратов.

Данные об эффективности и безопасности липосомальных препаратов, полученные на лабораторном уровне, часто не поддаются воспроизводству в масштабе промышленного производства. Это в значительной степени объясняется тем, что физико-химические свойства липосом, полученных в малом масштабе, не воспроизводятся в условиях промышленного получения. Хотя размеры и электрический заряд липосом измеряются и достаточно четко указываются в методах в большинстве разработок по получению липосом, однородность липидных компонентов, экспозиция биохимически важных функ-

циональных групп на наружной поверхности липосом, фиксированная толщина водного слоя, число липидных бислоев и т.д. зависит от масштаба производства. Кроме того, свойства липосом во многом определяются присутствием в них холестерина, жирнокислотным составом липидов, наличием тех или иных доменов липидов в структуре мембраны. Стабильность липосом в значительной степени зависит от режима замораживания и лиофилизации, жирнокислотного состава липидов, которые должны быть минимально окислены по двойным связям, размера и заряда липосом.

Схема получения липосомального препарата сводится к следующим основным стадиям:

- получение липидной пленки; эмульгирование липидов в соответствующем буферном растворе или органическом растворителе;
- непосредственное получение липосом по одному из известных методов;
- отделение, при необходимости, не включенного в липосомы лекарственного вещества;
- осветляющая и стерилизующая фильтрация;
- разлив препарата в емкости;
- замораживание, лиофилизация, герметизация препарата в атмосфере инертного газа;
- контроль и хранение препарата при определенных условиях.

По нашему мнению, обязательными методами контроля полученных липосомальных форм лекарственных средств должно являться определение следующих параметров: величины частиц липосом, стерильности, безвредности, пирогенности, содержания включенного в липосомы вещества, количественное определение липидных компонентов и основного лекарственного вещества, pH, наличие стабилизаторов и др. *Необходимым является определение* в процессе изготовления и в готовом препарате *продуктов перекисного окисления*, например, индекса окисленности. Препараты необходимо контролировать по указанным параметрам как в процессе изготовления, так и в процессе хранения.

На основании обобщения результатов многолетних исследований предложена и реализована в производственных условиях технология получения липосомальных препаратов. В соответствии с данной схемой технология производства липосом включает *критические стадии*, которые будут рассмотрены в данной главе: 1 – получение субстанции липидов; 2 – получение липидной пленки; 3 – процесс получения липосом гомогенизацией липидной

эмульсии и включение лекарственного средства; 4 – отделение не включенного лекарственного средства; 5 – осветляющая и стерилизующая фильтрация; 6 – разлив препарата; 7 – лиофилизация препарата; 8 – контроль готового препарата; 9 – изучение стабильности и режима хранения.

Основные критические стадии процесса производства липосомальных препаратов приведены на рис. 3.



Рисунок 3 – Основные критические стадии процесса производства липосомальных препаратов

В данной главе не обсуждаются сырьевые источники липидных веществ, используемые для получения липосом, а также достоинства и недостатки природных и синтетических липидов, так как это является прерогативой каждой исследовательской группы, самостоятельно проводящей экспериментальный подбор оптимального состава липидной композиции для формирования липосом конкретного целевого назначения, и поэтому рекомендации здесь, по-видимому, нецелесообразны. Кроме того, ранее нами были подробно проанализированы принципы получения различных липидных субстанций для биомедицинских целей.

В качестве примера мы приводим протоколы получения липосомальных форм препаратов.

Протокол 1. Получение «свободных» липосом

Метод:

1. Готовят 10 мл раствора фосфатидилхолина яичного желтка (2000 мг) в безводном этаноле (концентрация – 20 %). Фосфатидилхолина не менее 93 % (примеси только фосфолипидной природы), индекс окисленности не более 0,2. Концентрацию липидов определяют по содержанию фосфора. Индекс окисленности определяют УФ-спектроскопией.

2. Получают липидную пленку в роторном испарителе при температуре 40–45 °С в течение 90 минут. Пленку обрабатывают азотом или аргоном.

3. Липидную пленку суспендируют в 80 мл соответствующего буферного раствора (рН – 6,5–6,8) до образования гомогенной эмульсии. Процедуру проводят при температуре 40–45 °С на *Vortex* в течение 30–45 минут в присутствии инертного газа или азота.

4. Эмульсию обрабатывают при высоком давлении 400–600 МПа в экструдере при температуре 40–45 °С под контролем размера частиц. При достижении размера 100 ± 20 нм процесс гомогенизации прекращают. В процессе экструзии в эмульсию добавляют криопротектор, например, лактозу в соотношении: фосфатидилхолин : лактоза 1 : (1–2). Работу проводят в атмосфере инертного газа, например, аргона.

5. Проводят фильтрацию эмульсии через фильтры с размером 0,45 и 0,22 нм.

6. Проводят разлив во флаконы.

7. Замораживают флаконы с эмульсией при минус 60–70 °С и лиофилизируют в течение 72 часов. Остаточной воды не более 5 %.

8. Флаконы герметизируют в атмосфере инертного газа.

9. Контроль образцов липосом.

Протокол 2. Получение липосом, содержащих биофлавоноиды

Метод:

1. Готовят 10 мл раствора кверцетина (100 мг) в безводном этаноле (концентрация 1,0 %).

2. Готовят 10 мл раствора фосфатидилхолина яичного желтка (4000 мг) в безводном этаноле (концентрация – 40 %). Фосфатидилхолина не менее 93 % (примеси только фосфолипидной природы), индекс окисленности не более 0,15. Концентрацию липидов определяют по содержанию фосфора. Индекс окисленности и содержание биофлавоноидов определяют УФ-спектроскопией.

3. Смешивают раствор фосфатидилхолина и раствор кверцетина, перемешивают при температуре 40–45 °С в течение 10–15 минут.

4. Получают липидную пленку в роторном испарителе при температуре 40–45 °С в течение 90 минут. Пленку обрабатывают азотом или аргоном.

5. Липидную пленку суспендируют в 100 мл соответствующего буферного раствора (рН – 6,5–7,3) до образования гомогенной эмульсии. Процедуру проводят при температуре 40–45 °С на *Vortex* в течение 60 минут в присутствии инертного газа или азота.

6. Эмульсию обрабатывают при высоком давлении 400–600 МПа в экструдере при температуре 40–45 °С под контролем размера частиц. При достижении размера 120 ± 20 нм процесс прекращают. В процессе экструзии в эмульсию добавляют криопротектор, например, лактозу в соотношении: фосфатидилхолин : лактоза 1 : (2–4). Работу проводят в атмосфере инертного газа, например, аргона.

7. Проводят фильтрацию эмульсии через фильтры с размером 0,45 и 0,22 нм.

8. Проводят разлив во флаконы.

9. Замораживают флаконы с эмульсией при минус 60–70 °С и лиофилизируют в течение 72 часов. Остаточной воды не более 5%.

10. Флаконы герметизируют в атмосфере инертного газа.

11. Контроль образцов липосом.

Протокол 3. Получение липосом, содержащих антрациклиновый антибиотик

Метод:

1. Готовят 10 мл раствора фосфатидилхолина яичного желтка (1000 мг) в безводном этаноле (концентрация – 10 %). Фосфатидилхолина не менее 93 % (примеси только фосфолипидной природы), индекс окисленности

не более 0,15. Концентрацию липидов определяют по содержанию фосфора. Индекс окисленности определяют УФ-спектроскопией.

2. Готовят раствор антрациклинового антибиотика (доксорубицина, эпирубицина, идарубицина, митоксантрона) в соответствующем буферном растворе (с учетом конечной концентрации в образцах 1–2 мг/мл при pH 6,5–7,5). Содержание антрациклиновых антибиотиков определяют методом ВЭЖХ.

3. Получают липидную пленку в роторном испарителе при температуре 40–45 °С в течение 90 минут. Пленку обрабатывают азотом или аргоном.

4. Липидную пленку суспендируют в 100 мл соответствующего буферного раствора (pH – 6,5–7,5) до образования гомогенной эмульсии. Процедуру проводят при температуре 40–45 °С на *Vortex* в течение 30–45 минут в присутствии инертного газа или азота.

5. Эмульсию обрабатывают при высоком давлении 400 МПа в экструдере при температуре 40–45 °С под контролем размера частиц. При достижении размера 90 ± 20 нм процесс прекращают. Работу проводят в атмосфере инертного газа, например, аргона.

6. Создают условия для химического градиента за счет технологии градиента pH или технологии градиента концентрации сульфата аммония с загрузкой активной фармацевтической субстанции – антрациклинового антибиотика. При необходимости проводят удаление не включенной субстанции. В эмульсию добавляют криопротектор, например, лактозу в соотношении: фосфатидилхолин : лактоза 1 : (1–3).

7. Проводят фильтрацию эмульсии через фильтры с размером 0,45 и 0,22 мкм.

8. Проводят розлив во флаконы.

9. Замораживают флаконы с эмульсией при минус 60–70 °С и лиофилизируют в течение 72 часов.

10. Флаконы герметизируют в атмосфере инертного газа.

11. Контроль образцов липосом.

На рис. 4 и рис. 5 приведены схемы технологии получения липосомальных препаратов с использованием гидрофобной и гидрофильной субстанций.

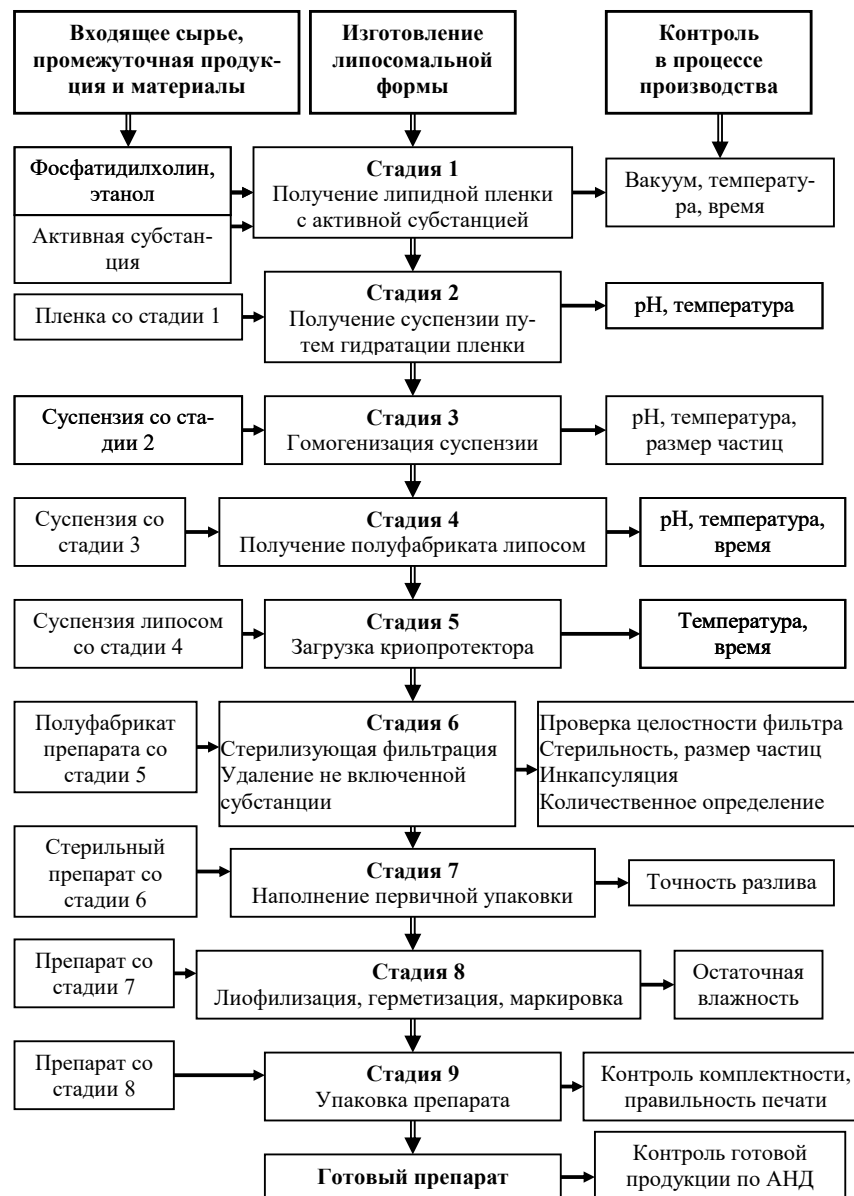


Рисунок 4 – Технологическая схема производства липосомальной формы биофлавоноида кверцетина

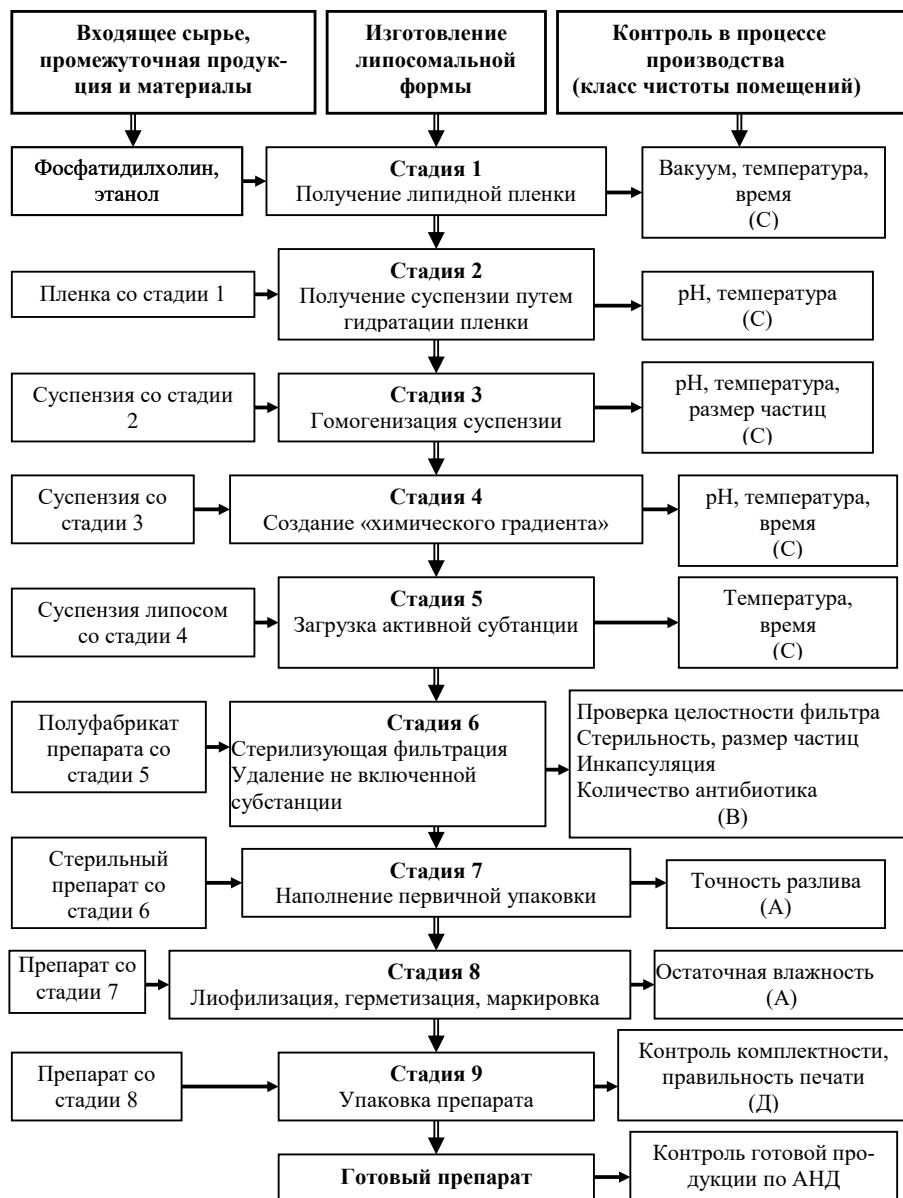


Рисунок 5 – Технологическая схема производства липосомальной формы антрациклиновых антибиотиков

2.1. Липидные субстанции

На первом этапе необходимо провести изучение используемых липидных субстанций и органических растворителей, применяемых в технологии получения липосомальных препаратов. Растворители (этанол, хлороформ, диэтиловый эфир и др.), используемые в ходе производственного процесса должны контролироваться на наличие примесей, в том числе, и токсических. Данные, полученные нами, показывают, что содержание остаточных растворителей, используемых при производстве липидных субстанций и липосомальных препаратов соответствуют общепринятым нормам, а в готовом препарате после лиофилизации либо не определяются, либо их количество минимально, что отвечает требованиям международных фармакопей. Содержание эндотоксинов и тяжелых металлов в липидных субстанциях, их контаминация микроорганизмами должны контролироваться в соответствии с требованиями, предъявляемыми к субстанциям для инъекционных препаратов. Для снижения контаминации липидных субстанций возможна стерилизующая фильтрация липидов в растворе органического растворителя, например, фосфатидилхолина в этаноле. Кроме того, одним из методов снижения контаминации липидных субстанций может быть их обработка органическими растворителями, например, хлороформом. Особое внимание необходимо уделять процессам разложения субстанций под воздействием света, нагревания, величины рН, кислорода воздуха и ряда других факторов, влияющих на структуру липидов. Также важно привести краткое описание продуктов, которые рассматриваются как потенциальные примеси, возникающие в результате выделения и очистки липидов из природных источников или полученных синтетическим путем. На рис. 6 представлена схема промышленного способа выделения природного фосфатидилхолина как пример получения липидной субстанции.



Рисунок 6 – Схема промышленного способа выделения природного фосфатидилхолина

2.2. Получение липидной пленки

Вторым этапом технологии, согласно предложенной схемы, является получение липидной пленки, которое проводят при постоянном перемешивании раствора липида в органическом растворителе при температуре 37–42 °С. Получение липидной пленки осуществляют при упаривании раствора в вакууме. При использовании гидрофобного препарата его растворяют в соответствующем органическом растворителе и смешивают с раствором липида. На этой стадии критичные факторы – температура и величина вакуума, обеспечивающего быструю концентрацию липидов.

На следующем этапе полученную липидную пленку или пленку липида с лекарственной субстанцией эмульгируют в буферном растворе с целью получения мультиламеллярных везикул. Необходимо отметить, что температура в процессе ресуспендирования должна быть выше температуры фазового перехода липидов. При получении везикул необходимо учитывать, кроме температуры, ряд факторов: величину рН и ионную силу буфера, концентрацию липидов и соотношение липид: лекарственное средство, физико-химические свойства используемых компонентов. Размер образующихся везикул определяется так же интенсивностью и временем перемешивания. Кроме этого, необходимо в каждом конкретном случае учитывать заряд липидов. Для предотвращения процессов окисления липидов – липосом полученную эмульсию насыщают азотом или инертным газом.

Следующим этапом является получение липосом. В настоящее время известен ряд способов получения липосомальных препаратов:

- ✓ озвучивание;
- ✓ методы, основанные на спонтанной везикуляции и на удалении детергентов;
- ✓ инъекция;
- ✓ экструзия.

2.3. Получение липосом

Озвучивание – процесс получения липосом с помощью ультразвука. *Недостатком этого метода* является крайне низкая производительность, окисление и гидролиз липидов, длительность технологического процесса, повышение температуры реакционной смеси, а также то, что полученные липосомы недостаточно устойчивы в процесс хранения и требуют дополнительных мероприятий по стабилизации. Кроме того, обнаружена низкая стандартность полученных препаратов, проявляющаяся в неоднородности состава. Использование озвучивания неэффективно в ряде случаев, т.к. некоторые лекарственные вещества не выдерживают режимов обработки ультразвуком. Обработка ультразвуком приводит к развитию процессов перекисного окисления фосфолипидных компонентов липосом. Так, например, по нашим данным, ультразвуковая обработка фосфолипидных смесей различного состава при 22 кГц в течение 10–45 минут при температуре 25 ± 5 °C сопровождается увеличением индекса окисленности в 2–3 раза.

Рядом авторов предложено комбинированное использование методов для получения липосом. Так, например, при получении липосом, содержащих цитостатик цисдиаминдихлорплатин, первоначально проводили ультразвуковую обработку при 22 кГц в течение 3–5 минут, а затем замораживание в жидком азоте, с последующим оттаиванием при комнатной температуре. Процесс повторяли 6 раз. По данным авторов, в липосомы включалось 50–60 % от исходной концентрации платины. По данным большинства авторов, использование ультразвуковой обработки позволяет получать липосомы с низкой эффективностью включения веществ во внутреннее пространство.

Метод спонтанной везикуляции – основан на спонтанном образовании липосом при быстром подщелачивании водных дисперсий, содержащих фосфолипиды. *К недостаткам данного метода* можно отнести ограниченность в использовании фосфолипидного состава (фосфатидилхолин, фосфатидная кислота), высокую скорость процесса, что затрудняет использование этого метода в промышленных условиях при получении больших объемов липосомальных препаратов. Кроме того, высокое значение pH (более 9,0), а также определяющие значение температурного режима, делает данный метод не приемлемым для ряда лекарственных и биологически активных веществ.

Инъекция – получение липосом путем впрыскивания в водную среду раствора фосфолипидов в летучем органическом растворителе. *К недостаткам этого метода* необходимо отнести низкую эффективность включения в липосомы лекарственных веществ, необходимость удаления растворителя из препарата, нестандартность состава липосом. Кроме того, липосомы, полученные инъекцией или методом удаления детергента, отличаются низкой стабильностью. *К преимуществам метода* можно отнести возможность влияния на размер липосом за счет температуры водной среды, растворителя, скорости перемешивания и концентрации фосфолипидов.

Экструзия – данный процесс осуществляется в гомогенизаторах высокого давления, в результате происходит разрушение крупных мицелл при пропускании липидной эмульсии под высоким давлением через специальный клапан при температуре выше фазового перехода липидов, используемых в составе липосом. *Преимуществом этого метода* является стандартность состава липосом, высокая производительность метода, минимальное окисление и гидролиз фосфолипидов, сохранность лекарственного препарата, стабильность липосом. Существенное значение имеет наличие стандартного промышленного оборудования для работ под высоким давлением и получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, при этом в ходе процесса возможен контроль значений температуры и давления.

Данный режим позволяет получить липосомы стандартного состава, основная масса которых представлена частицами размером 80–160 нм (80–90 % всех липосом) до лиофилизации и 120–180 нм после лиофилизации. С целью стабилизации весь процесс экструзии проводят в атмосфере инертного газа, например, аргона. При этом любой газ должен проходить через стерилизующий фильтр с размером пор не более 0,2 мкм. Эмульсия должна подвергаться многократной циркуляции через гомогенизатор с тем, чтобы при каждом проходе получать все большее количество малоразмерных липосом, непрерывно охлаждаться для отвода тепла, выделяемого насосом при сжатии. Таким образом, критическими параметрами являются температура, давление в гомогенизаторе, количество проводимых циклов. Учитывая, что при работе гомогенизатора образуются аэрозоли, а субстанции ряда лекарственных препаратов, например, цитостатиков (доксорубин гидрохлорид, цисплатин, доцетаксел и др.) относятся к веществам повышенного класса

опасности, работу необходимо проводить в изоляторе. Помещение гомогенизатора в изолятор также обеспечивает минимальный риск контаминации. Необходимо производить обязательную санитарную обработку гомогенизатора при переходе от одного препарата к другому. Воду, используемую для получения липидной эмульсии, следует регулярно контролировать на химическую и биологическую контаминацию, а также на контаминацию эндотоксинами, поскольку включение эндотоксинов в липосомы имеет необратимый характер и в таком случае очистка готового препарата от пирогенов практически не достижима.

Получению растворов лекарственных средств и криопротекторов, например, лактозы необходимо уделять особое внимание. Несмотря на то, что приемлемый уровень контаминации при контроле микробиологической чистоты составляет не более чем 10 КОЕ/100 мл раствора, при работе следует использовать растворы, подвергнутые стерилизующей фильтрации, что гарантирует минимальную контаминацию в процессе изготовления готового препарата. Кроме того, актуальным является вопрос депирогенизации компонентов с использованием различных видов фильтрации через специальные фильтры.

Использование гомогенизаторов высокого давления позволяет получить липосомы с заданными характеристиками. Преимуществом последнего способа является возможность больших загрузок (до 150 литров препарата в сутки), получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, стандартность и реальная возможность постоянного контроля за температурой и давлением.

Так, по данным ряда авторов, при получении «пустых» липосом, оптимальной является температура 30–35 °С и давление $5,8 \cdot 10^7$ – $6,2 \cdot 10^7$ Па. Данный режим позволяет получать липосомы стандартного состава – основная масса липосом представлена частицами размером 100–140 нм (до 90 % всех липосом). Индекс окисленности липосом, полученных данным способом, не превышал 0,4. Исходный показатель индекса окисленности яичного фосфатидилхолина не более 0,25. В то же время, индекс окисленности при получении липосом указанного состава и размера из фосфатидилхолина при использовании ультразвука составлял 0,7–0,9. Использование липосом ука-

занного размера в качестве лекарственного средства для внутривенного введения возможно в связи с их размером, низкой степенью окисленности и отсутствием продуктов гидролиза. Гомогенизацией при высоком давлении получены липосомальные формы цитостатиков и препараты липосом, обладающие гепатозащитным действием. При получении липосом с антибиотиками антрациклинового ряда (доксорубин, идарубин, эпирубин) показано, что размер липосом до лиофилизации составлял 120 ± 30 нм, а после лиофилизации 140 ± 40 нм. Так же показано, что включение в липосомы холестерина приводит к увеличению размера частиц, полученных после лиофилизации, до 300 ± 50 нм и снижению количества цитостатика, связанного с липосомами. Введение в состав липосом кислых фосфолипидов, например, дифосфатидилглицерина, приводило к повышению включения антрациклинов на 8–12 %. Индекс окисленности «нагруженных» липосом не превышал 0,37–0,42.

Показано, что небольшие, около 100–120 нм, ПЭГ-липосомы могут проходить через поры в эндотелии кровеносных сосудов к опухоли и внедряться в межклеточное пространство. При этом инкапсулированный в липосомы доксорубин освобождается из липосом в ткани опухоли.

Интерес представляют работы по включению в липосомы доксорубина гидрохлорида. Авторы этих работ осуществляли подкисление внутреннего объема липосом, вследствие чего проникшие в него нейтральные молекулы субстанции присоединяют протон, приобретают положительный заряд и уже не могут выйти во внешнюю среду. Чем ниже pH внутри липосом, тем больше вещества перераспределяется из внешнего объема во внутренний. Однако через некоторое время величина pH внутри и снаружи липосомы выравнивается, так как протоны довольно хорошо проникают через мембрану и, следовательно, концентрация вещества внутри и вне липосом также выравнивается. Авторы предложили заполнять липосомы не кислым буфером, а раствором аммония сульфата. При гидролизе этой соли образуется аммиак, который будучи молекулой незаряженной легко проникает через мембрану и выходит во внешний раствор. Липосомы получают путем диспергирования липидной пленки в цитратном или фосфатном буферном растворе с величин-

ной pH 3,5–5,5. Механизм инкапсуляции, например, антрациклиновых антибиотиков в липосомы можно представить следующим образом: при попадании солянокислой формы антрациклинового антибиотика во внешний буферный раствор, содержащий фосфатный буферный раствор с величиной pH 6,5–7,5 создается равновесие, в результате чего часть антибиотика переходит в молекулярную форму и адсорбируется на поверхности липосомы, проходя при этом через липидный бислой мембраны во внутреннее пространство. Внутри липосомы молекула протонируется с помощью протона, полученного в результате диссоциации цитрата натрия или по реакции обмена с ионом аммония; при этом молекула антибиотика теряет способность проходить через липидный бислой и в результате этого происходит процесс накопления антибиотика внутри липосомы. В другом случае, ион аммония, отщепляя протон, превращается в газообразный аммиак в молекулярной форме, который проходит через мембрану липосомы в среду, окружающую липосому. Включение антибиотика, например, доксорубина гидрохлорида в липосому составляет 75–85 % от исходного количества субстанции.

Рядом исследователей предлагается технология получения комбинированных липосомальных препаратов доксорубина гидрохлорида, в которой гидратацию липидной пленки проводят 250 мМ раствором аммония сернокислого при температуре, которая выше фазового перехода используемых липидов при 50 °С. Данная технология представлена на рис. 7. Характеристика полученного препарата представлена в табл. 3.

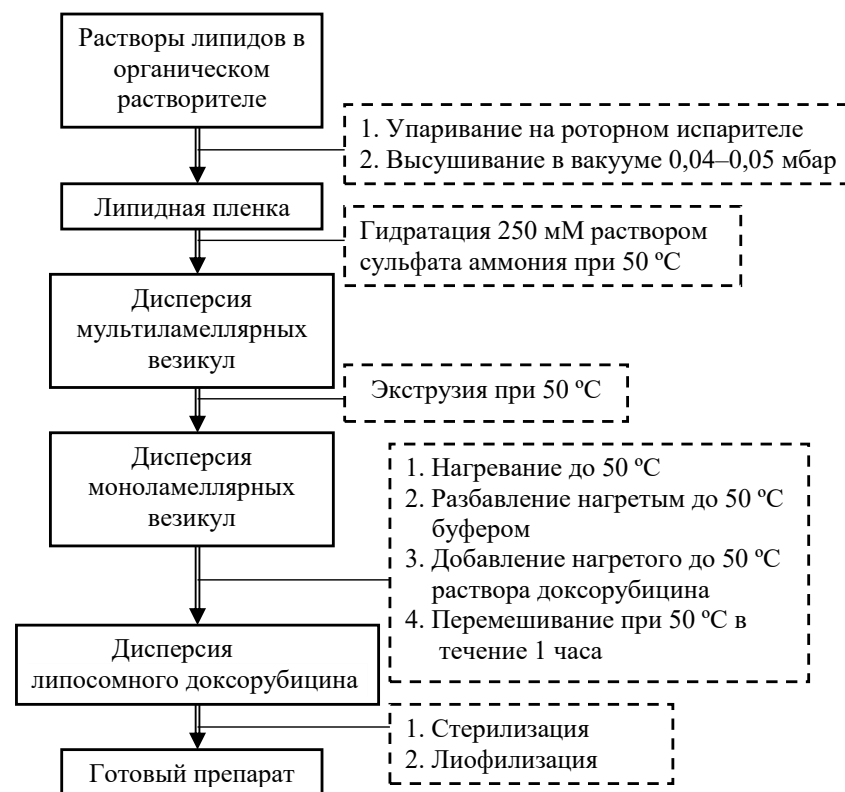
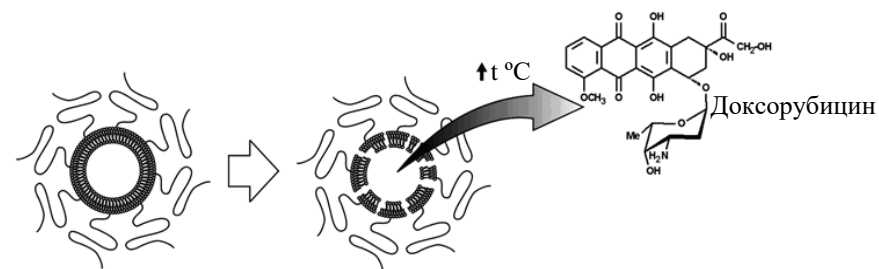


Рисунок 7 – Схема оптимизации метода получения в полупромышленных масштабах стерически стабилизированных термочувствительных активно загруженных доксорубином липосом

Таблица 3 – Основные характеристики липосомального препарата доксорубицина

Свойства препарата	
Липидный состав	<i>DPPC:DSPC:DSPE-PEG-200 : Chol</i> (*) (9 : 1 : 0,02 : 0,2)
Размер липосом	230– 250 нм
Размер липосом после регидратации лиофилизированного препарата	240–270 нм
Концентрация доксорубицина	0,4 мг/мл
Степень включения доксорубицина	85–92 %
Степень включения доксорубицина после регидратации лиофилизированного препарата	не менее 80 %
Соотношение субстанция / липид	0,2

(*) *DPPC* – дипальмитоилфосфатидилхолин;
DSPC – дистеароилфосфатидилхолин;
DSPE-PEG-200 – дистеароилфосфатидилэтаноламин + полиэтиленгликоль;
Chol – холестерин.

При получении липосом гомогенизацию липидной эмульсии проводили при указанной температуре. Авторы предложили для достижения необходимой для загрузки концентрации сульфата аммония проводить разведение в 20 раз, что позволяет в дальнейшем отказаться от гельфльтрации или ультрафльтрации.

Для получения липосом использовали липиды в соотношении: *DPPC : Chol : DSPE-PEG-200 : DSPE-PEG-3400* (0,65 : 0,3 : 0,045 : 0,005). В качестве криопротектора при лиофилизации препарата использовали лактозу в конечной концентрации 5,0 %. Соотношение доксорубицина гидрохлорида и липидов составляло 0,20 : 1,0. При использовании данного метода включение доксорубицина в липосомы составляло 80–90 %. Покрытие липосом полиэтиленгликолем позволяет создать липосомальные препараты, которые в минимальной степени взаимодействуют с окружающей сре-

дой, например, с белками плазмы крови. Установлено, что полиэтиленгликоль действует как барьер препятствующий прикреплению белков плазмы к поверхности липосом и замедляет клиренс липосом из кровотока у мышей, обнаруживая крайне слабое взаимодействие между ПЭГ-липосомами и белками плазмы.

Для метода получения липосом с использованием градиента концентрации сульфата аммония наиболее часто используют смеси липидов: дипальмитоилфосфатидилхолин : холестерин (2 : 1); гидрогенизованный соевый фосфатидилхолин : гидрогенизованный соевый фосфатидилинозит : холестерин (9 : 1 : 4); гидрогенизованный соевый фосфатидилхолин : холестерин : дистеароилфосфатидилэтаноламин с полиэтиленгликолевыми группами (55 : 40 : 5).

Количество циклов гомогенизации является критичным, поскольку в ходе работ было обнаружено, что нередко увеличение цикличности или давления приводит к нестабильности липосом, увеличению их размеров или сливанию. Контроль процесса гомогенизации необходимо оценивать по размеру липосом, и при увеличении этого параметра процесс следует прекращать. При получении липосомальных препаратов использовалось давление $5 \cdot 10^7 - 7 \cdot 10^7$ Па. Конкретное значение величины давления должно подбираться в каждом конкретном случае с учетом использования липидного состава, химической структуры активной субстанции лекарственного средства, величины рН, заряда и т.д.

Условия гомогенизации необходимо подбирать для каждого вида липосом, причем определяющим является величина липосом и степень включения субстанции. На стабильность липосом и включение вещества в их состав оказывает влияние ионная сила, величина рН, температура проведения технологического процесса. Кроме того, самостоятельное значение имеет стабильность самого лекарственного средства (субстанции), включаемого в липосомы. Так, например, температура, рН и давление определяли не только степень включения доксорубицина гидрохлорида в липосомы, но и антибактериальную активность полученного препарата, в случае включения антибиотика.

Существенным фактором является введение криопротекторов в состав препаратов. Определяющее значение при этом имеют химическая структура

криопротектора, его концентрация, форма введения и момент введения в процессе гомогенизации, т.е. при каком уже присутствующем в аппарате размере липосом (на каком цикле) производить его добавление, так как некоторые протекторы углеводной природы (например, лактоза или трегалоза) могут на первом этапе привести к нежелательному изменению размера липосом и снижать включение в них лекарственного средства. При этом особое внимание нужно уделять достижению необходимого размера липосом и исключению их агрегации.

При изучении фармакокинетики липосом установлено, что комплектстимулирующий захват липосом в печени крыс зависит как от размера липосом, так и от содержания в них холестерина. В то же время при введении в организм крыс липосом с диаметром 200 нм содержание холестерина в них не определяло захват данных везикул печенью. При использовании липосом с большим диаметром (800 нм) или средних с диаметром 400 нм их захват печенью крыс увеличивался по мере увеличения содержания в липосомах холестерина.

Показана возможность получения стерически стабилизированных липосом, используемых для доставки лекарств. В состав липосом вводили 1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламин-поли-этиленоксид-конъюгат. Показано, что термодинамически стабильные моноламеллярные липосомы образуются спонтанно путем простой гидратации жидкой фазы бислойных фосфолипидных пленок. Рассмотрено защитное действие полимеров на примере липосом. Обсуждается механизм, предполагающий, что сшитые с поверхностью липосом цепи гибких и гидрофильных полимеров образуют плотные «конформационные облака», препятствующие взаимодействию других макромолекул с поверхностью липосом, даже при низких концентрациях защитного полимера.

Получены липосомы из димиристоилфосфатидилхолина, или дипальмитоилфосфатидилхолина, или фосфатидилхолина соевых бобов. Полученная суспензия липосом полностью сохраняла свои физико-химические свойства в жидком виде в течение 6 месяцев при комнатной температуре хранения. С целью стабилизации водных суспензий липосом, предложено использовать различные полиэтиленгликольные липиды для покрытия. Установле-

но, что существует возможность формирования липосом различного типа: многослойные, малые и большие однослойные, обладающие высокой стабильностью в буферных растворах. За 6 месяцев хранения наблюдалось освобождение не более 5 % маркера. Интерес представляют препараты липосом направленного действия. Предложена технология включения в липосомы пептидно-липидных конъюгатов, участвующих в дестабилизации липосом вблизи локализации клеток, секретирующих пептидазы. При этом происходит освобождение заключенных в липосомы лекарственных средств, предназначенных для воздействия на секретирующие пептидазы клетки, и при этом происходит адресная доставка лекарственного препарата. Установлена возможность использования Ca, Ba, Al – альгинатов для инкапсулирования фосфолипидных липосом при конструировании системы доставки лекарственных препаратов с помощью перорального применения. Перспективным может оказаться использование такого рода систем для доставки лекарственных веществ пептидной природы, в частности, инсулина. Инкапсулирование липосом, загруженных лекарственными субстанциями обеспечивает их доставку в определенные участки желудочно-кишечного тракта с одновременным контролем скорости выхода лекарства для достижения пролонгированного эффекта. Установлено, что липосомы, нагруженные инсулином и помещенные в альгинатные капсулы в различной степени отдают гормон-инсулин при исследовании его содержания в различных отделах желудочно-кишечного тракта. Наилучшие результаты продемонстрированы при использовании Ba-альгинатов. Именно этот препарат характеризовался самым низким выходом инсулина в кислой среде желудка.

Интерес представляет работа ученых Национального института стандартов и технологии (США), которые предложили оригинальный способ получения липосом. Получены наночастицы с размером 50–150 нм. Метод заключается в следующем:

1. Получены мембраны путем протравливания мельчайших каналов в кремниевой пластине с использованием методов, применяемых при изготовлении интеграционных схем.
2. Фосфолипидные субстанции растворяли в изопропиловом спирте.

3. Субстанции активных фармацевтических субстанций растворяли в водной фазе, например, в буферном растворе с определенным значением pH и ионной силой.

4. Методика получения липосом заключалась в следующем: фосфолипиды растворенные в изопропиловом спирте поступали через центральный входной канал в смесительный канал, где встречается со струей жидкости водного раствора, поступающего по двум боковым каналам.

5. Компоненты смешиваются благодаря диффузии вдоль поверхности текущих потоков жидкости, приводя к самосборке молекул фосфолипидов в наноразмерные частицы (липосомы) контролируемого размера.

Авторы данного метода установили, что процесс образования липосом существенно зависит от характеристики течения и смешивания потоков жидкости. Размер липосом возможно регулировать воздействием на скорость потоков, что в сочетании с размерами каналов устройства определяет условия, при которых происходит смешивание жидкостей. Сильно сфокусированный поток фосфолипидов в изопропиловом спирте текущий с малой скоростью стремится быстро смешаться с буферным раствором в начальной части смесительного канала и при этом образуются липосомы небольшого размера, например, около 50–75 нм. Менее сфокусированный поток, имеющий высокую скорость, проходит дальше по длине канала, увеличивая тем самым время смешивания жидкостей, и приводит к образованию крупных липосом, например, около 100–150 нм. Эта технология получила название «COMMAND» (Controlled Microfluidic Mixing and Nanoparticle Determination). Необходимо отметить, что нами не обнаружено сообщений о применении данного метода при промышленном получении липосомальных препаратов.

Как видно из представленных данных, в основном, возможно *четыре* пути включения различных лекарственных субстанций в липосомы:

- водорастворимые вещества включаются во внутренний водный объем;
- в гидрофобную область бислоя;
- адсорбция на поверхности;
- химическое связывание с компонентами бислоя.

Возможна также комбинация способов включения. На рис. 8 показаны способы включения различных лекарственных субстанций в липосомы.

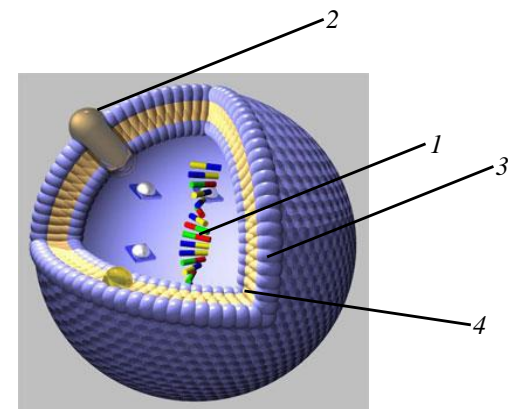


Рисунок 8 – Способы включения различных лекарственных субстанций в липосомы: 1 – включение во внутренний водный объем (водорастворимые вещества); 2 – включение в гидрофобную область бислоя; 3 – адсорбция на поверхности; 4 – химическое связывание с компонентами бислоя

2.4. Отделение невключенной в липосомы субстанции

Перед стерилизующей фильтрацией возможно проведение отделения невключенного в липосомы лекарственного препарата путем микрофильтрации на мембранах, изготовленных из разнообразных материалов. Эти мембраны могут применяться в виде плоских, трубчатых или других картриджей. После формирования липосом, содержащих лекарственный препарат, возникает необходимость разделения смеси, состоящей из «свободного» препарата и «нагруженных» липосом. Наиболее предпочтительным является процесс ультрафильтрации липосомального препарата для отделения несвязавшегося лекарственного средства. С этой целью целесообразно использовать аппараты с различным порогом отсеивания, например, от 5 кД до 300 кД. При этом в каждом конкретном случае необходимо определять условия ультрафильтрации, которые в значительной степени зависят от молекулярной массы вещества, его концентрации, заряда. Разработчик должен по своему усмотрению определять температурные условия ультрафильтрации, порог разделения, скорость и давление при проведении процесса. Проводить ультрафильтрацию необходимо в строгих условиях асептики на оборудовании, прошедшем

специальную антимикробную обработку. Фильтрация проводится при относительно низких давлениях. В пермеате может находиться не включенное в липосомы вещество. Мембраны можно использовать с различным порогом отсека (20, 50, 100 кД и др.). В каждом конкретном случае необходимо подбирать условия проведения микрофильтрации. Если невозможна фильтрация препаратов с высоким содержанием липидов, целесообразно установить концентрацию, позволяющую получить препарат, обеспечивающий стерилизующую фильтрацию, а только затем проводить концентрирование препарата путем микрофильтрации. При этом также возможно отделение не включенного в липосомы компонента.

2.5. Стерилизующая фильтрация

Следующей критической стадией является стерилизующая фильтрация. С целью подбора оптимального фильтрующего материала должны производиться исследования, приводящие к минимальной сорбции активной субстанции и липосом. Режим и способ фильтрации должны минимально влиять на стабильность липосом и не приводить к снижению фармакологического действия получаемого препарата.

Учитывая, что в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи фильтры с размерами пор 0,22 и 0,1 мкм являются приемлемыми для стерилизующей фильтрации, мы использовали их без дополнительного обоснования. Использование фильтров с большим размером пор, в комбинации с дополнительной стерилизацией, должно пройти валидацию. Наиболее часто используемый метод стерилизации – стерилизующая фильтрация через каскад фильтров типа «Millipore», с величиной пор от 1,2 до 0,22 мкм. Необходимо отметить, что указанная фильтрация позволяет так же проводить стандартизацию препаратов липосом. Данные, полученные рядом авторов, свидетельствуют о возможности фильтрации липосом с величиной 0,1–0,35 мкм через фильтры с величиной пор 0,22 мкм. При этом потери липосом составляют не более 1–3 %. Полученные препараты содержат липосомы с величиной 60–240 нм. В ряде случаев, при работе с липосомами более крупных размеров, стерилизующая фильтрация становится невозможной. В таких случаях существует возможность получения липосом в асептических условиях, либо проведение последующей термической стерилизации. Последнее

предусматривает стерилизацию при температуре 112–121 °С в течение 10–20 минут. Однако, по нашему мнению, использование термической стерилизации определяется рядом факторов: липидным составом липосом – их стабильностью к окислению; термостойкостью веществ, вводимых в липосомы. Так, например, при стерилизации липосом, содержащих липиды с насыщенными жирными кислотами, не обнаружено изменения физико-химических и биологических свойств препаратов. Для придания «жесткости» структуре липосом предложено вводить в их состав урсоловую или олеанолеву кислоту. Липосомы получали из дипальмитоилфосфатидилхолина. В качестве маркеров использовали кальцин и 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен. Показано, что введение в состав липосом указанных веществ вызывает умеренное изменение текучести жидкокристаллической мембраны липосом и значительную конденсацию как кристаллических, так и жидкокристаллических мембран липосом. Авторами показано, что аналогичное действие оказывает введенный в липосомы холестерин. По-видимому, одним из вариантов стерилизации липосомальных препаратов может быть метод радиационной стерилизации γ -облучением и потоком ускоренных электронов. Данный метод был предложен для стерилизации наночастиц из полибутилцианоакрилата, содержащих доксорубин. Оптимальной дозой является 15 кГр, причем, облучение в дозе 15 кГр не приводило к деструкции наночастиц и доксорубина. Для определения использования γ -облучения с целью стерилизации фосфолипидных наночастиц должны быть проведены специальные исследования.

Вследствие того, что при стерилизующей фильтрации существует потенциальный дополнительный риск контаминации, непосредственно перед наполнением флаконов может быть целесообразна вторая фильтрация через добавочный стерилизующий фильтр, задерживающий микроорганизмы. Последнюю стерилизующую фильтрацию необходимо осуществлять как можно ближе к месту наполнения флаконов. Фильтр не должен оказывать влияния на стерилизуемую продукцию, например, вследствие удержания её ингредиентов или выделения в неё веществ. Преимуществом стерилизующей фильтрации является отделение водонерастворимого компонента, не включившегося в липосомы. Кроме того, необходимо исключить способность фильтра отделять волокна или, по крайней мере, свести этот процесс к минимуму. Целостность фильтра должна быть проверена применением и подтверждена

сразу после использования (точечный пузырек, диффузный поток и др.) Необходимо на всех стадиях технологического процесса осуществлять мероприятия, сводящие к минимуму возможную контаминацию.

2.6. Разлив препарата и лиофилизация липосом

После получения стерильного раствора препарата его разливают в асептических условиях, замораживают при температуре минус 40–60 °С, лиофилизируют и проводят герметизацию в атмосфере защитного газа. По имеющимся данным, липосомы размером больше 220–250 нм и меньше 100 нм менее стабильны в процессе лиофилизации, чем препараты липосом с размером 140–200 нм. Проведение процесса лиофилизации определяется рядом факторов: величиной и зарядом липосом, фосфолипидным составом и физико-химическими свойствами вводимого в них вещества, структурой бислоя и другими факторами. Вследствие этого, режим лиофилизации необходимо определять для каждого предлагаемого препарата.

Следующим этапом при получении липосомальных препаратов, требующих валидации, является сублимационное высушивание. От обоснованного режима сублимации зависит стабильность липосом, количество включенного в липосомы лекарственного препарата и, наконец, размер липосом. С помощью лиофилизации можно получить стабильный сухой препарат липосом, легко восстанавливаемый при добавлении воды. Это требует тщательного управления процессом дегидратации, так как процесс лиофилизации включает замораживание препарата с последующим удалением воды, и возникает проблема, связанная с тем, что на стадии замораживания и обезвоживания возможно физическое повреждение структуры липосом. Одним из наиболее важных факторов при лиофилизации является подбор криопротектора, который не должен иметь эвтектические свойства, т.е. не должен кристаллизоваться при замерзании. Немаловажным вопросом является определение этапа для введения криопротектора в липосомальный препарат, например, сахаров. Надо учитывать, что необходимо создание защитной среды как во внутренней, так и наружной поверхности мембраны липосомы. Так, например, при получении липосом с кварцетином используются различные количества криопротектора – сахаров. При получении «Липофлавона» используется соотношение: фосфатидилхолин : лактоза (1 : 1), в то время как в

дальнейших исследованиях установлено, что соотношение: липиды : лактоза (1 : (3–4)) приводит к более стабильным результатам после лиофилизации. Имеются данные что при использовании в качестве криопротектора сахарозы это соотношение составляет 1 : 2. Появляются сообщения о возможности использования в качестве криопротекторов и других соединений. Так, например, для защиты липосом, содержащих доксорубицин гидрохлорид предложено при лиофилизации использовать в качестве криопротектора мочевины.

При типичном цикле замораживания и сушки внешнюю температуру снижают с постоянной скоростью, пока эта температура не окажется ниже температуры замерзания продукта. Скорость охлаждения выбирают такой, чтобы могли образовываться кристаллы льда, что впоследствии облегчает сублимацию воды из замороженного образца. Как правило, температура изменения матрицы растворенного вещества дисахаридов (сахароза, мальтоза, лактоза) находится между минус 30 °С и минус 33 °С, а моносахаридов (глюкоза и фруктоза) – между минус 40 °С и минус 48 °С. Считается, что применение криопротекторов с более высокими температурами изменений матрицы имеет преимущества, в том числе ускорение первичной сушки. Начальную фазу дегидратации называют первичной сушкой, и она, в значительной мере, включает в себя сублимацию воды из кристаллов льда. Во время первичной сушки температура продукта остается существенно ниже внешней в результате потери тепла при испарении воды. Когда первичная сушка закончена, температура продукта повышается и становится равной внешней температуре в лиофилизаторе. В этот момент внешнюю температуру можно повысить, чтобы облегчить удаление остатков воды в процессе, именуемом вторичной сушкой. В задачу исследователя-разработчика входит отработка ряда критических точек, в том числе температура конденсора, время предварительного замораживания, определение точки эвтектики, определение времени сублимации и ряд других факторов. Необходимо создать условия, при которых вещества подвергаются минимальным химическим превращениям, т.е. при замораживании при низких температурах химические реакции практически не идут, а при повышении температуры на конечных стадиях скорость химических процессов, в частности перекисное окисление липидов, сведено к минимуму за счет вакуума (10^1 – 10^3 мм рт. ст.) – отсутствия кислорода.

Процесс сублимации липосом сводится к двум стадиям: первоначально удаляется свободная вода до 80–85 %, причем, скорость сушки постоянна и занимает 40–50 % общего времени; на второй стадии удаляется до 95–98 % воды, находящейся в связанном состоянии, т.е. входящей в структуру липосом. Установлено, что ряд факторов влияет на скорость и качество процесса сублимации: концентрация липидов и вспомогательных веществ в препарате, объем высушиваемого препарата и площадь поверхности испарения, наличие и свойства криопротектора. Концентрация вещества в препарате должна определяться фармакологическими исследованиями и технологическими возможностями. При использовании низких концентраций фосфатидилхолина и лактозы нами получен препарат в «не оформленной» таблетке (массе), который обладал высокой гигроскопичностью, что приводило к «оседанию» массы и её плавлению. Избыток липидов приводит, с одной стороны, к значительным трудностям при стерилизующей фильтрации, а с другой стороны – к повышенной остаточной влажности и в результате к «оплавлению» массы. Нами было установлено, что оптимальным для эффективности липосом, полученных из фосфатидилхолина и их стабильности в процессе хранения является содержание остаточной влажности после процесса лиофилизации не менее 2,0 % и не более 5,0 %. Важность данных о соотношении вода / липиды подтверждены и другими авторами, которые установили, что наилучшие результаты получены с липосомами, содержащими 12–35 моль воды на моль липидов.

Учитывая, что разность давления паров определяет интенсивность процесса сублимации, можно для этого использовать два пути: а) повышение давления пара над поверхностью высушиваемых липосомальных препаратов; б) снижение давления в окружающей среде за счет конденсации пара на охлаждаемой поверхности. По нашим данным, для липосомальных препаратов предпочтительнее второй путь. Оптимальной является температура конденсатора, при которой происходит полное связывание всего водяного пара, достигающего охлажденной поверхности – от минус 70 °С до минус 80 °С; отношение поверхности испарения к объему высушиваемого препарата должно быть минимальным. Важным условием для оптимизации процесса является получение кристаллов льда как можно меньших размеров, чтобы обеспечить наибольшую поверхность сублимации и минимальное повреждение липосом

кристаллами. Стабилизирующее вещество (криопротектор для липосомального препарата) в каждом конкретном случае должно быть определено экспериментальным путем. Для липосомальных препаратов наилучшие результаты получены при использовании соединений углеводной природы – сахаров. Рассматривая факторы, действующие на липосомы во время лиофилизации, можно определить ряд повреждающих моментов, например, при начальном процессе замораживания рост кристаллов льда в массе раствора приводит к тому, что среда вокруг липосом становится гипертонической, в результате чего на мембраны липосом воздействует более высокое давление. Это может вызвать повреждение бислоя, что ведет к вытеканию препарата или к слиянию соседних мембран. Образование кристаллов льда внутри липосом может вызвать повреждение структуры из-за механического разрыва. Более подробно вопрос о влиянии размеров липосом, их заряда, роли отдельных липидов, состава криопротектора рассмотрен нами ранее.

В результате проведенных исследований были отработаны следующие режимы, рекомендованные для сублимации липосомных препаратов:

- время сублимации: от 90 до 100 часов;
- время предварительного замораживания: от 48 до 56 часов;
- температура замораживания от минус 50 °С до минус 70 °С;
- период постоянной скорости в течение 45–50 часов, при этом температура препарата от минус 45 °С до минус 25 °С;
- период падающей скорости в течение 45–50 часов, при этом температура препарата от минус 25 °С до 25 °С;
- температура конденсатора от минус 70 °С до минус 80 °С;
- остаточная влажность – 2,5–4,5 %.

Приведенный режим лиофилизации позволяет получить препарат, стабильный в процессе хранения; количество включенного вещества уменьшается незначительно – до 10 %; размер липосом не увеличивается более чем на 10–15 %.

При разработке фармацевтических препаратов необходимо уделять особое внимание задачам, связанным с устойчивостью липосом при хранении продукта, т.к. известно, что липосомы обнаруживают «утечку» лекарства и липидную деградацию в течение интервала времени между их пригото-

нием и использованием больными. Необходимо различать *два вида стабильности* – химическую стабильность компонентов липидов и основного вещества; стабильность связывания между липидами и лекарственным веществом. Стабильность химического состава можно достичь подбором оптимальных температурных режимов хранения. Для стабилизации комплексов используют замораживание – высушивание в присутствии криопротекторов. При этом получают дегидратируемые липосомальные формы препаратов, которые легко сохраняются и при регидратации водой удерживают более 90 % лекарственного средства. Так, например, липосомальные формы доксорубина выдерживают хранение в лиофильно высушенном виде более 1 года. Таким образом, *основным критерием подбора криопротекторов* является сохранение изучаемым веществом стабильности при дегидратации мембран липосом.

Хотя с помощью лиофилизации можно получить стабильный сухой препарат липосом легко восстанавливаемый при добавлении воды, это требует тщательного управления процессом дегидратации. Так как процесс лиофилизации включает замораживание препарата с последующим удалением воды, то возникает проблема, связанная с тем, что на стадиях замораживания и обезвоживания возможно физическое повреждение липосом. Так, в качестве криопротектора для липосом предложено использование циклической инулогексозы (минус 25 °С).

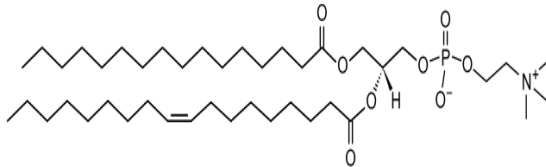
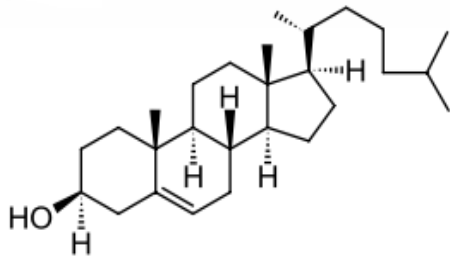
Одним из наиболее важных факторов, определяющим степень защитного действия на липосомы во время дегидратации сахаров, является размер липосомы. Как известно, при увеличении среднего диаметра липосомы наблюдается соответствующее увеличение «утечки», вызванной лиофилизацией. Везикулы среднего диаметра около 100 нм и меньше обеспечивают максимальную сохранность содержимого. Это повышение стабильности с уменьшением размеров липосомы имеет место только для везикул не менее 50 нм. «Утечка» после дегидратации из более мелких везикул значительно выше, чем из соответствующих липосом диаметром более 100 нм. Кроме того, мелкие липосомы более склонны к слиянию, чем более крупные. Возможно, что липосомам, имеющим больше одного двойного слоя, присуща большая чувствительность слияния при дегидратации или регидратации, чем уни-

меллярным везикулам. Липидный состав липосом также определяет стабильность препаратов во время дегидратации и регидратации при использовании криопротекторов. В полностью гидратированных бислоях проницаемость значительно уменьшается за счет включения холестерина и возрастает при увеличении степени насыщения ацильных цепей фосфолипидов.

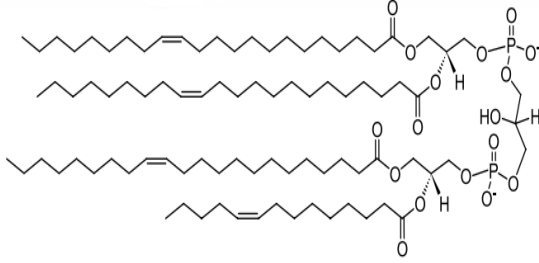
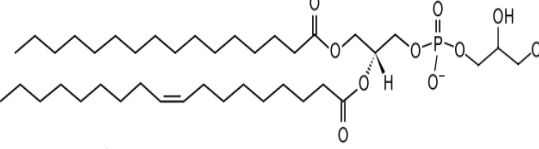
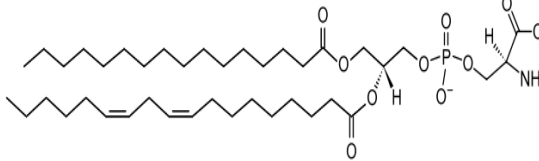
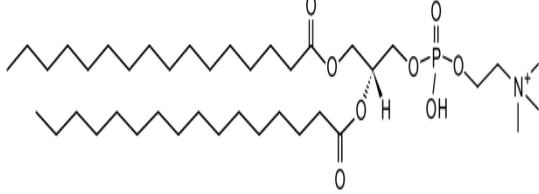
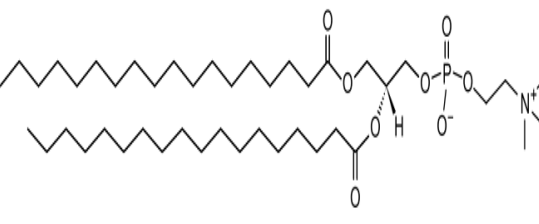
Однако при исследовании «утечки» при дегидратации или регидратации в зависимости от состава везикул, четкой корреляции между степенью «утечки» и физическими свойствами бислоя не было обнаружено. В больших униламеллярных везикулах (средний диаметр около 100 нм), состоящих из яичного фосфатидилхолина, добавление холестерина в мольных отношениях до 40 % не оказывало влияния на содержание карбоксифлуоресцеина.

В табл. 4 представлена структура липидных субстанций, используемых в составе липосом.

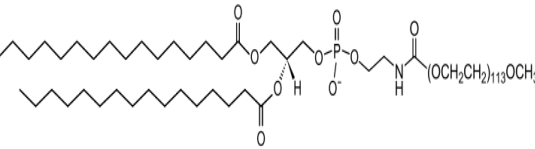
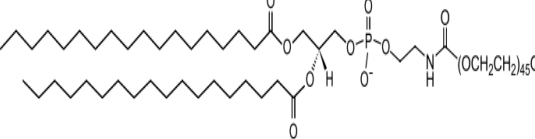
Таблица 4 – Структура липидных субстанций, используемых в составе липосом

Липидная субстанция	Структура
1	2
Фосфатидилхолин	
Холестерин	

Продолжение таблицы 4

1	2
Дифосфатидилглицерин	
Фосфатидилглицерин (яичный)	
Фосфатидилсерин (соевый)	
Дипальмитоил-фосфатидилхолин	
Дистеароил-фосфатидилхолин	

Продолжение таблицы 4

1	2
Дипальмитоил-фосфатидилэтанол-амин-ПЭГ-5000	
Дистеароилфосфатидил-этанол-амин-ПЭГ-2000	

В то же время в везикулах, состоящих из дипальмитоил-фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерина (мольное отношение 10 : 1) при включении около 40 % холестерина отмечалась достоверно большее включение карбоксифлуоресцеина. Другие исследователи сообщили, что везикулы из дипальмитоилфосфатидилхолина, дегидратированные в присутствии циклической иноулогексозы, характеризуются максимальным содержанием карбоксифлуоресцеина при включении в двойной слой 20 % холестерина. При исследовании «утечки» после дегидратации / регидратации униламиллярных липосом, приготовленных из фосфатидилхолинов с различным составом жирных кислот, наибольшее включение наблюдается в системах, содержащих полностью насыщенные цепи, такие как дипальмитоил-фосфатидилхолин. Поражает, однако, то, что наблюдаемые различия относительно невелики, учитывая, что дипальмитоилфосфатидилхолиновые липосомы находятся в состоянии геля при температуре ниже 41 °С, в то время как другие изученные соединения (например, диолеилфосфатидилхолин) находятся при этой температуре в жидкокристаллическом состоянии.

Аналогично этому, при исследовании влияния головки фосфолипидов на «утечку», вызванную дегидратацией, трудно объяснить наблюдаемые различия простыми физическими характеристиками. Например, везикулы, приготовленные из смесей яичного фосфатидилхолина и яичного фосфатидил-глицерина, характеризуются возрастанием «утечки», вызванной дегидратацией при увеличении содержания в липосомах фосфатидилхолина. В то же

время у везикул, приготовленных из других кислых фосфолипидов, таких как фосфатидилсерин, фосфатидная кислота или фосфатидилинозит, степень включения содержимого та же, что и у везикул из фосфатидилхолина. Также показано, что везикулы, состоящие из 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилхолина и фосфатидилсерина, удерживают по существу весь включенный в них изоцитрат при дегидратации в присутствии мальтозы или трегалозы.

Описанные выше исследования наводят на мысль, что степень сохранения барьера проницаемости везикул в присутствии сахаров-криопротекторов определяется достаточно сложным взаимодействием факторов. К этим факторам могут относиться взаимодействия между головной группой фосфолипида и сахаром, химической структурой липида, термотропным фазовым поведением липида, природой примененного криопротектора и размером везикулы. В случае везикул, приготовленных методом экструзии, этот последний параметр теоретически может регулироваться, однако возможны незначительные различия среднего размера, распределения размеров или ламеллярности в функции состава липида.

Защита липосом во время лиофилизации может предусматривать *предотвращение слияния везикул, сохранение барьера проницаемости двойного слоя* или и то и другое. Из этих двух компонентов предотвращение слияния достигается легче и, вероятно, предъявляет меньше требований к свойствам криопротектора. При этом торможение слияния может потребовать только минимизации взаимного наложения везикул. Поэтому для любого успешного криопротектора, если сахарная матрица, образованная путем дегидратации, находится при температуре, ниже температуры замерзания, эта весьма жесткая структура должна удовлетворять требуемым критериям. Однако достижение этой цели можно облегчить, если сахар взаимодействует с головками фосфолипидов и создает стерический барьер для сохранения двойных слоев, даже если во время цикла лиофилизации везикулы концентрируются между кристаллами льда.

Обращаясь к более трудной проблеме сохранения барьера проницаемости двойного слоя и к рассмотрению механизма, посредством которого лиофилизация может вызвать «утечку», необходимо проанализировать ряд этапов процесса в целом. Было исследовано, происходит ли «утечка» преимущественно во время замораживания образца, в течение фазы дегидратации / ре-

гидратации или в результате повышения проницаемости регидратированных везикул. Хотя замораживание и оттаивание суспензии липосом может вызвать значительную «утечку» инкапсулированного растворенного вещества, степень этой «утечки» зависит от размера и состава везикул. Везикулы ограниченного размера (малые униламеллярные везикулы) чувствительны к слиянию, вызванному замораживанием и оттаиванием, и характеризуются также выраженной «утечкой», причем это действие могут тормозить некоторые сахара. Размер больших везикул обычно не изменяется, и «утечка» из них намного меньше, чем из соответствующих малых систем. В отличие от обычных криопротекторов (например, глицерин), способных эффективно предотвращать вызванную замораживанием / оттаиванием «утечку» из больших липосом, сахара (например, трегалоза), обладают в лучшем случае лишь умеренной защитной способностью. Это способствует тому, что по меньшей мере часть потери растворенного вещества, происходящей во время дегидратации / регидратации липосом, вызывается процессом замораживания. Однако прямое сравнение «утечки», вызванной лиофилизацией и замораживанием / оттаиванием, затруднительно. Хотя оба процесса содержат этап замораживания, во время лиофилизации оттаивание как таковое не происходит. Поэтому возможно, что потеря растворенного вещества, наблюдаемая после цикла замораживания / оттаивания, происходит только на этапе оттаивания и не оказывает воздействия на «утечку», вызванную лиофилизацией. При сравнении «утечки» растворенного вещества из везикул, подвергшихся либо циклу замораживания / оттаивания, либо только лиофилизации, отмечается, что «утечка» обнаруживается в большей степени после регидратации сухих липосом. Это заставляет предположить, что в результате самого процесса дегидратации на липосомный барьер проницаемости воздействуют дополнительные напряжения, отличные от сил, действующих во время замораживания. Наконец, рассматривая этап, на котором «утечка» инкапсулированного вещества происходит во время лиофилизации, следует также отметить, что перед восстановлением первоначальной проницаемости везикул после регидратации может наблюдаться также период повышения проницаемости двойного слоя. Этот эффект, возможно, отражает зависящую от времени переупаковку фосфолипидов внутри бислоя.

С учетом того факта, что для многих липосом различного состава, лиофилизированных в присутствии сахара-криопротектора, из носителя теряется только часть первоначально инкапсулированного вещества, возникло предположение, что эта «утечка» может происходить из множества везикул внутри популяции. Например, в популяции больших липосом среднего диаметра 100 нм за наблюдаемой «утечкой» из первичной популяции может быть ответственна группа более крупных везикул. Либо частичная «утечка» содержимого везикул может отражать осмотически обусловленный лизис с повторным образованием (герметизацией) везикул после изменения осмотического градиента. Эти предположения привели к оценке «утечки» из везикул во время множественных циклов лиофилизации. Если потеря инкапсулированного вещества происходит из множества чувствительных везикул или отражает рассеяние осмотического градиента, во время последующих циклов дегидратации / регидратации можно ожидать лишь небольшую дополнительную «утечку» или ее отсутствие. Однако это предположение не подтверждено имеющимися данными. Если образцы липосом, содержащие карбоксифлуоресцеин, подвергнуть двум циклам лиофилизации и регидратации и измерить «утечку» после каждого цикла, потеря инкапсулированного вещества наблюдается как после первого, так и после второго цикла дегидратации / регидратации. Далее, после каждого цикла «утечка» одна и та же. Эти данные поддерживают представление, согласно которому «утечка», вызванная дегидратацией, возможно, отражает напряжения, действующие на все везикулы, и не устраняется предварительным обновлением липосом.

Для объяснения механизма, посредством которого некоторые сахара способны защищать дегидратированные липосомы, был предложен целый ряд гипотез. Первоначально предполагали, что сахара могут образовывать водородную связь с полярными головками фосфолипидов и замещать молекулу воды в лиофилизированном состоянии. Относительные защитные свойства различных углеводов связывали как с числом гидроксильных групп, доступных для водородной связи, так с их пространственной ориентацией на сахаре. Позже эта модель была уточнена в свете способности ряда сахаров модифицировать термотропные характеристики липидов. Температура, при

которой фосфолипидные мембраны переходят из геля в жидкокристаллическую фазу, зависит от степени их гидратации. Как установлено, температура перехода из геля в жидкокристаллическое состояние для дипальмитоилфосфатидилхолина снижена до 68 °С для безводного и до 41 °С для полностью гидратированного липида. Аналогичное снижение температуры перехода из геля в жидкокристаллическое состояние может быть достигнуто при ассоциации указанного липида с дисахаридом трегалозой. Эти наблюдения дали основание предположить, что во время дегидратации суспензии липосом мембрана фосфолипидов может совершать фазовый переход и что «утечка» инкапсулированного вещества может быть следствием этого перехода. Поэтому возникло предположение, что трегалоза и другие сахара, способные сохранять безводные липиды в жидкокристаллическом состоянии, предотвращают такой фазовый переход и тем самым уменьшают «утечку» инкапсулированного вещества. Прямое доказательство взаимодействия между трегалозой и безводным дипальмитоилфосфатидилхолином было получено при ЯМР-исследованиях твердого состояния липидов. Эти исследования показали, что в смесях дипальмитоилфосфатидилхолин – трегалоза при температурах выше 46 °С липид принимает ту форму, которую называют λ -фазой. В этой фазе жирные ацильные цепи неупорядочены, подобно жидкокристаллической фазе, но ряд их групп иммобилизован в результате связывания с трегалозой. Доказано, что при температурах ниже 46 °С λ -фаза медленно переходит в гель.

Сведения, посвященные взаимодействию между углеводами и фосфолипидами и влиянию сахаров на термотропные свойства липидов, достаточно противоречивы. Прежние представления о прямом взаимодействии между дисахаридами и фосфолипидами в гидратированном состоянии базировались на исследовании монослоев, что дало основание думать, что трегалоза и прочие сахара создают увеличение площади на молекуле липида. Далее другие исследователи показали, что трегалоза и сахароза мало влияют как на температуру перехода гель – жидкокристаллическая фаза, так и на энтальпию перехода полностью гидратированного дипальмитоилфосфатидилхолина, что указывает на отсутствие взаимодействия сахара и липидов. Эти наблюдения

способствовали созданию представления о том, что взаимодействие между сахарами и фосфолипидами происходит только в безводном состоянии. Кроме того, трегалоза может снижать температуру перехода из геля в жидкокристаллическое состояние безводных фосфолипидов при совместной лиофилизации из органического растворителя. В то же время, при гидратировании липосом из воды в присутствии трегалозы наблюдается значительно более сложное термотропное поведение. Например, в случае липосом из 2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина и фосфатидилсерина после дегидратации существуют переходы, как при высокой, так и при низкой температуре, не зависящие от соотношения трегалоза – липид в исходном образце, что указывает на присутствие как гелевого, так и жидкокристаллического домена. Возникло предположение, что эти фазовые домены отражают внутренний и наружный участки двойного слоя и являются результатом различий между отношениями трегалоза – липид по обе стороны мембраны. Согласно этой гипотезы наружный монослой находится в жидкокристаллическом состоянии, а внутренний – в состоянии геля.

В дополнение к вопросам, касающимся трактовки исследований, занимавшихся непосредственно взаимодействиями сахар – липид, гипотеза, согласно которой сахара тормозят вызванную дегидратацией «утечку», предотвращая фазовые переходы липида, несовместима с целым рядом других наблюдений. Как отмечалось ранее, если бы фазовые переходы были ответственны за «утечку», это означало бы, что состав липида сильно влияет на стабильность двойного слоя. Однако наблюдалось, что различия в «утечке» карбоксифлуоресцеина из фосфатидилхолиновых везикул с неодинаковым составом жирных кислот незначительны, несмотря на большие различия температур перехода из геля в жидкокристаллическую фазу. В случае везикул, состоящих из яичного фосфатидилхолина, различия в «утечке» карбоксифлуоресцеина при содержании холестерина незначительны, даже при высоких концентрациях стерина, при которых можно было бы ожидать устранения перехода из геля в жидкие кристаллы (хотя включение холестерина может повысить включение инкапсулированного вещества при некотором составе липидов). Далее везикулы, состоящие из дипальмитоилфосфатидилхолина,

при дегидратации при комнатной температуре должны находиться в состоянии геля до дегидратации, в дегидратированном состоянии и после регидратации. Несмотря на отсутствие фазового перехода, из этих липосом также происходит значительная «утечка» инкапсулированного вещества. Наконец, если дегидратированные везикулы дипальмитоилфосфатидилхолина регидратируют при температуре выше или ниже температуры фазового перехода, наблюдается одинаковая степень содержания карбоксифлуоресцеина. Эти результаты трудно согласовать с представлением о том, что «утечка» инкапсулированного вещества является следствием дестабилизации бислоя в результате фазового перехода липида и о том, что защитное действие некоторых сахаров отражает предотвращение таких переходов. Эти несовместимости были осознаны сторонниками гипотезы фазового перехода, которые в ответ предположили, что в присутствии трегалозы в везикулах, состоящих из яичного фосфатидилхолина, диолеоилфосфатидилхолина или дипальмитоилфосфатидилхолина, фазовый переход при дегидратации и регидратации при комнатной температуре не происходит. Утверждают, что везикулы, состоящие из ненасыщенных липидов (яичный фосфатидилхолин, диолеоилфосфатидилхолин), в течение всего времени остаются в жидкокристаллической фазе, в то время как везикулы дипальмитоилфосфатидилхолина остаются в фазе геля. Однако этот аргумент кажется спорным. В случае везикул, состоящих из ненасыщенных липидов, на начальном этапе замораживания во время лиофилизации температура полностью гидратированных везикул снижается до значений, которые намного ниже их фазового перехода. Даже допуская тот факт, что образец не заморожен первоначально в жидком азоте или в смеси сухой лед / этанол, первичная сушка будет проводиться при температуре ниже температуры коллапса криопротектора (от минус 30 °C до минус 35 °C для дисахаридов), что намного ниже температуры фазового перехода липида (от +4 °C до минус 21 °C, в зависимости от состава жирных кислот). Поэтому после замораживания везикулы будут находиться в состоянии геля. Если во время дегидратации образовался комплекс сахар – липид, существующий в жидкокристаллической или в λ -фазе, то ясно, что липид должен совершить фазовый переход. Если такой комплекс не образовался, то везикулы

перейдут из геля в жидкокристаллическую фазу после регидратации при комнатной температуре. Аналогично этому для везикул дипальмитоилфосфатидилхолина, даже если они поддерживаются в состоянии геля при замораживании, первичной и вторичной сушке, регидратация при 50 °С приведет к переходу в жидкокристаллическую фазу (температура фазового перехода – 41 °С для полностью гидратированного липида). Наблюдаются лишь небольшие различия в «утечке» карбоксифлуоресцеина в случае везикул из дипальмитоилфосфатидилхолина, регидратированных при 30 °С и при 50 °С.

Исследователями *проведено изучение стабильности липосом, содержащих карбоксифлуоресцеин, в процессе лиофилизации и хранения.* В качестве стабилизаторов использовали ряд сахаров: сахарозу, маннит, лактозу, трегалозу и др. Наилучшие результаты получены при использовании трегалозы. По мнению авторов, часть защитного эффекта трегалозы и других сахаров может быть обусловлена способностью действовать как промежуточная матрица между везикулами, предотвращая их сближение. Последнее может быть связано с тем, что одной из предпосылок к мембранному слиянию является тесное сближение двух бислоев. По-видимому, в каждом случае необходимо изучать роль отдельных сахаров как стабилизаторов липосом. Подтверждению этому служит работа, в которой авторы для стабилизации липосом использовали лактозу. Сравнение данного сахара с трегалозой, мальтозой, глюкозой продемонстрировало явное преимущество. Вероятно, дисахара проявляют большую стабилизирующую активность дегидратированных мембран липосом. Кроме того, установлено, что лактоза должна присутствовать по обеим сторонам липосом, в связи с чем ее добавление в процессе изготовления препарата проводили на разных стадиях. Необходимо так же учесть доступность лактозы и разрешение ее использования в составе инъекционных форм в фармакопеях многих стран.

При лиофилизации многослойных липосом с целью их стабилизации использовали в качестве криопротектора олигомеры глюкозы – мальтодекстрины. Показано, что по мере повышения в составе липосом, полученных из дипальмитоилфосфатидилхолина, количества глюкозидных остатков

температура фазового перехода липидов от геля в жидкокристаллическое состояние возрастала.

Изучение влияния режима замораживания и лиофилизации проведено в работе, в которой использовали липосомы, состоящие из дипальмитоилфосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерина в соотношении 10 : 1. В липосомы включали карбоксифлуоресцеин. Липосомы замораживали медленно со скоростью 0,5 °С в минуту до температуры минус 60–70 °С или быстрым погружением в жидкий азот. Авторами установлено, что медленное замораживание приводит к значительно большему содержанию карбоксифлуоресцеина после лиофилизации и регидратации, чем при быстром замораживании. Влияние скорости замораживания зависит от липидного состава. Так, более «жесткие» липосомы, содержащие холестерин, сохраняли свою структуру в большей степени при медленном замораживании. В то же время режим замораживания не влиял на взаимодействие фосфолипидов с криопротекторами сахарозой, трегалозой, глюкозой.

Основное количество работ, посвященных защите липосом от повреждения при лиофилизации, сосредоточивалось на целостности двойных слоев во время этапов замораживания и лиофилизации, на изучении проницаемости бислоев липосом, полученных из дипальмитоилфосфатидилхолина и дипальмитоилфосфатидилглицерина (молярное соотношение 10 : 1) с добавленным снаружи карбоксифлуоресцеином. Результаты показали, что лиофилизация и регидратация липосом с сахарозой внутри и снаружи везикул вызывает временное повышение проницаемости бислоя для карбоксифлуоресцеина, который уравнивался примерно через 20 часов. Количество карбоксифлуоресцеина на моль фосфолипида, проникающего в везикулы, повышалось с увеличением отношения размера везикул (диапазон 0,1–1,0 мкм). Уменьшение числа двойных слоев в везикулах повышало проницаемость для карбоксифлуоресцеина после лиофилизации и регидратации. Присутствие холестерина уменьшало степень прохождения в везикулы. Авторами установлено, что за повышенную проницаемость после лиофилизации – дегидратации как в присутствии, так и в отсутствие сахарозы ответственны процессы уплотнения бислоев. Одновременно показано, что, несмотря на присутствие

криопротектора, «уплотнение» компонентов бислоя происходит как во время, так и после регидратации.

В заключении хотелось бы отметить, что лиофилизация состоит из нескольких этапов, каждый из которых может вызывать появление различных изменений. Следует понимать, что оптимальная защита липосомального образца не может быть достигнута с помощью только одного средства. Начальное замораживание образца может привести к значительной утечке или деформации бислоя в отсутствие криопротектора. Во время процесса дегидратации важно также обеспечить соблюдение обычных требований к лиофилизации. Растворенное вещество, как было показано выше, выбранное в качестве криопротектора, в идеале должно быть не эвтектическим. Этим требованиям соответствуют многие сахара. Первичная сушка должна проводиться при температуре ниже температуры коллапса матрицы. Температура коллапса дисахаров выше, чем моносахаров. Кроме того, следует понимать, что при последующей дегидратации бислоя липосом до полного восстановления барьера проницаемости может потребоваться повторный процесс замораживания и лиофилизации. Для готового лекарственного препарата необходимо определить оптимальный режим хранения, что в свою очередь непосредственно зависит от физико-химических свойств входящих в него компонентов: липидов и лекарственного средства. По данным литературы, температура хранения липосомальных препаратов находится в диапазоне от $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ (для липосомальной вакцины против гриппа (тип А)) до минус 10°C (для препарата «Липин», используемого как антигипоксическое средство).

2.7. Ресуспендирование липосом

Самостоятельным вопросом применения и контроля липосомальных лекарственных препаратов являются температура растворителя используемого для ресуспендирования лиофилизованного продукта и соотношение между массой препарата и объемом растворителя. Нами обнаружено, что температура растворителя в определенной степени определяет размер липосом и количество включенного в липосомы лекарственного средства. Так, например, при использовании растворителя с температурой от 37°C до 50°C для

ресуспендирования липосом нагруженных гидрофобной активной фармацевтической субстанцией (препарат «Липотакс») размер липосом на 7–12 % меньше, чем при использовании растворителя комнатной температуры. При использовании препаратов с гидрофильной субстанцией и / или «свободных» липосом их размер также был несколько меньше. По нашему мнению, подбор условий ресуспендирования зависит от липидного состава препарата, химической структуры криопротектора и активной фармацевтической субстанции, исходного размера липосом, содержания и соотношения компонентов. Исследования по определению условий ресуспендирования необходимо проводить для каждого конкретного препарата. Вопрос используемого растворителя (состав, рН, ионная сила) требует отдельного изучения, что связано с влиянием растворителя на размер липосом и снижением включения лекарственной субстанции в липосомы. Кроме того, необходимо обратить внимание на соотношение липосомального препарата и водного растворителя используемых как для определения размера липидов, так и для инфузионного введения препаратов. В инструкциях по применению необходимо указывать температуру ресуспендирования и температуру раствора готового препарата при инъекционном или инфузионном введении.

2.8. Контроль препарата

Следующим этапом получения липосомальных препаратов является контроль качества готового лекарственного препарата как после изготовления, так и в процессе хранения, с целью изучения стабильности. При изучении качественных показателей липосомальных препаратов мы исходили из определения трех групп показателей: I – показатели, характеризующие свойства индивидуальных биологически активных компонентов препарата (фосфатидилхолин, доксорубин гидрохлорид, антралин, кверцетин, амфотерицин В, доцетаксел и др.) и вспомогательных веществ (лактоза, витамин Е и др.); II – показатели качества, характеризующие готовую форму препарата; III – показатели, характеризующие свойства липосом. На рис. 9 приведены основные методы контроля липидных препаратов.

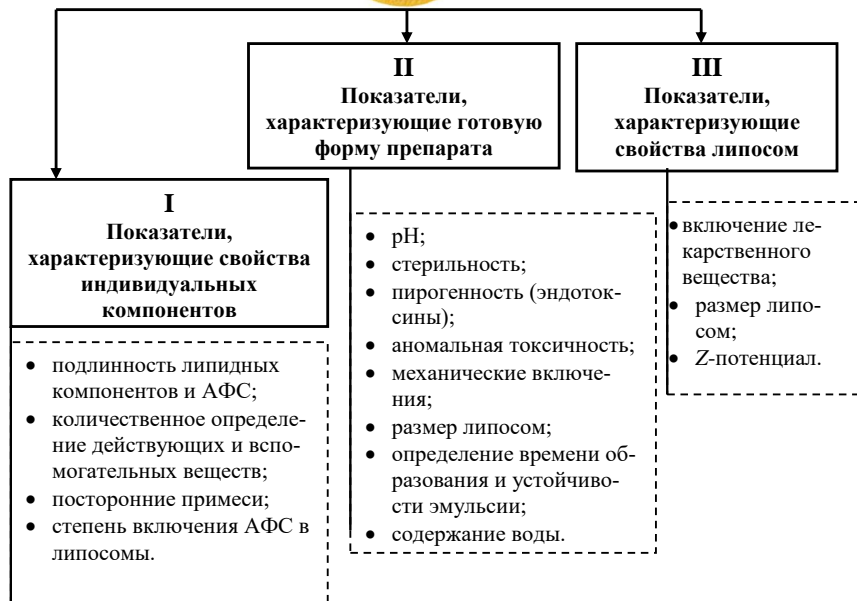


Рисунок 9 – Основные методы контроля препаратов

Испытания должны затрагивать те свойства продукта, которые подвержены изменениям при хранении и могут влиять на качество, эффективность и безопасность применения готового препарата, причем методы количественного определения должны позволять характеризовать стабильность. Особое внимание необходимо уделять профилю новых продуктов, образующихся при деградации (разложении) компонентов препарата. В этом случае эти новые продукты разложения необходимо квалифицировать. Так, например, должны быть идентифицированы и указаны граничные количества образующихся примесей, например, для фосфатидилхолина (лизопродукты или свободные жирные кислоты) или для доксорубина гидрохлорида (агликоны или другие продукты разложения). Важным вопросом является разработка метода определения количества включенного в липосомы лекарственного средства, причем такие определения должны проводиться как в процессе из-

готовления липосом и их лиофилизации, так и при хранении препарата в течение срока его годности. Этот вопрос должен решаться конкретно для каждого вида липосом непосредственно исследователем, при этом валидация является обязательным условием его использования.

К одному из проблемных вопросов можно отнести испытание на механическое включение (посторонние частицы). Их определение само по себе сложно, во-первых, так как препарат представляет собой эмульсионную жидкость, окрашенную в белый, красный, зеленый или желтые цвета, а во-вторых, препарат лиофилизирован, что требует высокого качества стекла и закупорочных материалов и разлива препарата в классе А.

Количество липосомальных форм препаратов увеличивается с каждым годом. Препараты находятся в разных фазах клинического изучения: от I фазы (препарат «SPI-77», представляющий собой липосомы из природных фосфолипидов величиной около 150 нм в диаметре, содержащий цисплатин, используемый для лечения широкого спектра опухолей); II фазы (препарат «Миказон», представляющий собой липосомы, состоящие из фосфолипидов и холестерина, величиной около 120 нм в диаметре, содержащий амиоцилин, используемый для лечения бактериальных и микобактериальных инфекций); III фазы (препарат Д-99, представляющий собой липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и холестерина, величиной 100 нм в диаметре, содержащий доксорубин) – до готовых препаратов, внедренных в промышленное производство и используемых для лечения больных. Например, «Липин», представляющий собой липосомы из фосфатидилхолина, величиной 140–180 нм, используемый для лечения синдрома острой и хронической дыхательной недостаточности, острого и хронического активного гепатита, цирроза печени и др.; «Доксил», представляющий собой липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и холестерина, величиной 80–120 нм в диаметре, содержащий доксорубин, используемый для лечения саркомы Капоши; «Амбизом», представляющий собой липосомы, состоящие из гидрогенизированного фосфатидилхолина сои, дистеароилфосфатидинглицерола и холестерина, используемый для лечения системных грибковых инфекций и содержащий Амфотерицин В; «Липофлавон», представляющий собой липосомы из фосфатидилхолина с включенным в них биофлавоноидом – кверцитином, величиной 120–180 нм, используемый для применения в кардиологии и офтальмологии; «Лиолив», представляющий собой липосомы из фосфатидилхолина с включенным в них гепатопротектором – антралем, величиной

150–180 нм, используемый для лечения заболеваний печени. По предлагаемой технологической схеме был получен ряд оригинальных липосомальных препаратов, характеристика которых приведена в табл. 5 и табл. 6.

Таким образом, приведенные данные доказывают перспективность получения липосомальных форм лекарственных препаратов. Необходимо отметить, что в каждом конкретном случае необходимо решать поставленные задачи, исходя из конечной цели: подбор липидных компонентов, источник их выделения и содержание; физико-химические свойства вводимого в липосомы вещества; способ получения липосом; состав консервантов и стабилизаторов; режимы лиофилизации и хранения и ряд других факторов, определяющих качество и биологическую активность липосомальной формы лекарственного средства.

Таблица 5 – Фармакопейная характеристика липосомальных лекарственных препаратов

Наименование препарата и описание	Действующее вещество и липидный компонент	pH и количество включенной лекарственной субстанции, %	Количественное определение на один флакон (г) и размер липосом (нм)	Биологические испытания (тест-дозы)
1	2	3	4	5
Липин, аморфная масса белого цвета	Фосфатидилхолин	5,0–7,2; 98–100 %	Фосфатидилхолина от 0,45 до 0,55; 140 нм	Апирогенен 12,5 мг/кг; атоксичен 5 мг/мышь; стерилен
Липодокс, аморфная масса красного цвета	Доксорубин Фосфатидилхолин	4,5–7,2; Не менее 85 %	Фосфатидилхолина от 0,45 до 0,55; Доксорубин от 0,009 до 0,011; 140 нм	Апирогенен 40,0 мг/кг; атоксичен 5 мг/мышь; стерилен
Липофлавоп, аморфная масса светло-желтого цвета	Кверцетин Фосфатидилхолин	4,5–7,2; Не менее 95 %	Фосфатидилхолина от 0,5 до 0,6; Кверцетин от 0,0125 до 0,0175; 180 нм	Апирогенен 50,0 мг/кг; атоксичен 5 мг/мышь; стерилен

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5
Лиолив, аморфная масса светло-желтого цвета	Антраль Фосфатидил- холин	4,5–7,2; Не менее 95 %	Фосфатидилхолина от 0,288 до 0,352; Антраля от 0,00357 до 0,00483; 180 нм	Апирогенен 32,0 мг/кг; атоксичен 3,2 мг/мышь; стерилен
Липоплат, аморфная масса белого цвета	Цисплатин Фосфатидил- холин	4,5–7,2; Не менее 80 %	Фосфатидилхолина от 0,36 до 0,44; Цисплатина от 0,009 до 0,0011; 160 нм	Апирогенен 32,0 мг/кг; атоксичен 4 мг/мышь; стерилен

Таблица 6 – Характеристика липосомальных форм лекарственных препаратов

Препарат, способ введения и год его внедрения	Область применения	Показания к применению	Дозы, курс лечения, дни
1	2	3	4
Липин, ингаляторно и инфузионно, 1991 г.	Кардиология	Инфаркт миокарда, нестабильная стенокардия	35 мг/кг по 4 раза в день; 4–9 дней
	Пульмонология	Синдром дыхательной недостаточности	10-15 мг/кг по 1–3 раза в день; 10–12 дней
	Нефрология	Пиелонефрит, диабетическая нефропатия, поликистоз почек	10-20 мг/кг 1 раз в день; 4 дня
	Акушерство	Поздний гестоз, внутриутробная гипоксия плода	5-10 мг/кг 1 раз в день; 10 дней
	Гастроэнтерология	Гепатиты, холецистит, цирроз печени	5-10 мг/кг 1 раз в день; 10 дней

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4
Липодокс , инфузионно, 1998 г.	Онкология	Саркома мягких тканей, рак молочной железы, рак желудка и др. (при резистентных формах)	50-65 мг на 1 м ² или 20-30 мг/кг в течение 3 дней (через 21 или 28 дней)
Лиолив , инфузионно, 2003 г.	Онкология	Гепатиты, цирроз печени	0,65-1,3 г 1 раз в день; 5-15 дней
Липофлафон , инфузионно, 2006 г.	Онкология	При предупреждении токсического поражения миокарда, при полихимиотерапии антрациклинами	1130 мг за день до введения цитостатика; 3 дня после введения цитостатика
	Кардиология	Острый инфаркт миокарда без зубца Q, стенокардия	1130 мг 2 раза в день; 5-10 дней
Липоплат инфузионно, 2007 г.	Онкология	Рак яичников, мочевого пузыря и др. (при резистентных формах)	50-100 мг на 1 м ² в виде однократной инъекции каждые 3-4 недели

Контрольные вопросы

1. Какие липиды предпочтительно использовать для получения липосом и опишите требования предъявляемые к ним?
2. Описать основные методы получения липосомальных частиц.
3. Вам необходимо доказать, что получены частицы с наноразмерами. Предложите методы исследования.
4. Опишите основные физико-химические методы контроля липосомальных препаратов.
5. Проанализируйте основные способы получения липосом и обоснуйте способ наиболее пригодный при промышленном производстве липосомальных препаратов.
6. Привести схему получения липосомального препарата с гидрофильной активной фармацевтической субстанцией.
7. Каким образом можно получить липосомы, используя метод экстракции под высоким давлением?
8. Докажите, что липосомальные продукты являются продуктом нанобиотехнологии.
9. Опишите основные фармакологические методы контроля липосомальных лекарственных форм.
10. Что такое криопротектор, и какие химические вещества используют при лиофилизации липосом?
11. Привести схему получения липосомального препарата с гидрофобной активной фармацевтической субстанцией.
12. Опишите основные стадии процесса лиофилизации липосом.
13. Какие методы используют для определения степени включения вещества в липосомы?
14. Как влияет температура раствора на проведение регидратации липосом?
15. Приведите основные критические стадии производства лекарственных липосомальных препаратов.
16. Предложите аппаратную схему получения липосомального лекарственного препарата.

ГЛАВА 3 ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

3.1. Липосомальные формы противоопухолевых препаратов в онкологии

Широкий интерес, проявляемый сегодня к нанопродуктам, в частности, к нанобиотехнологическим препаратам в фармации вполне объясним – эти средства, обладая широким спектром действия, интенсивно используются для диагностики, профилактики и лечения заболеваний различной этиологии.

Создание искусственных мембран (липосом) является одним из перспективных направлений современной нанобиотехнологии. *Липосомальные препараты обладают рядом несомненных преимуществ:*

- ✓ защищают клетки организма от токсического действия лекарственных средств;
- ✓ пролонгируют действие введенного в организм лекарственного средства;
- ✓ защищают лекарственные вещества от деградации;
- ✓ способствуют проявлению нацеленной специфичности за счет селективного проникновения из крови в ткани;
- ✓ изменяют фармакокинетику лекарственных препаратов, повышая их фармакологическую эффективность;
- ✓ позволяют создать водорастворимую форму ряда лекарственных субстанций, увеличивая тем самым их биодоступность.

Главной целью доставки лекарственных средств является система, которая позволила бы сохранить высокий уровень лекарственного препарата в крови после внутривенного введения. *Липосомы как никакая другая лекарственная форма препаратов решает этот вопрос.*

На протяжении последних 20 лет в практике мировой фармакологии интенсивно используются липосомальные препараты различной направленности. Эти препараты нашли широкое применение в химиотерапии опухолевых заболеваний, в вакцинологии, офтальмологии, пульмонологии и при лечении других патологических состояний.

Ранее уже были приведены коммерческие препараты (см. табл. 2), выпускаемые мировой фармацевтической промышленностью, а также препараты, находящиеся на различных этапах исследования. Как видно из приведенных данных большинство препаратов направлено на лечение опухолевых заболеваний.

Использование липосом при лечении рака базируется на возможности улучшения эффективности известных лекарственных средств за счет изменения фармакокинетики препарата, что приводит к высокой противоопухолевой активности и снижению токсичности. Необходимо отметить медленное высвобождение лекарственного средства из липосом, приводящее к пролонгированности действия и переносу липосомами нестабильных лекарственных препаратов, например, препаратов платины. Очень важным являются различия физиологии сосудов нормальных и опухолевых тканей, что определяет повышенный уровень поглощения липосом, содержащих цитостатики опухолевыми тканями. Именно, в связи с этим наноносители (липосомы) позволяют осуществить внутренний транспорт в опухолевую ткань высоких концентраций инкапсулированных препаратов: доксорубицина, цисплатина и других цитостатиков.

Высокий интерес онкологов к липосомам обусловлен их способностью более интенсивно накапливаться в опухолевой ткани. Так как опухолевые клетки растут очень быстро, полноценного развития эндотелия стенок кровеносных сосудов не происходит. Поэтому в опухолевых кровеносных сосудах образуются поры величиной 0,3–0,4 мкм. Кроме того, величина межклеточного интервала в опухолевой ткани также больше, чем в здоровых тканях. Вследствие этого липосомы с диаметром менее 200–300 нм могут проникать в опухолевую ткань и там накапливаться, что затруднено в здоровых тканях организма. Этот процесс известен как *EPR-эффект* (Enhanced Permeability and Retention) – *эффект повышенной проницаемости и накопления.*

Препараты антибиотиков антрациклиновой группы

Антрациклиновые антибиотики, в частности, *доксорубицин* входит во многие схемы химиотерапии различных опухолей. Доксорубицин получают из *Streptomyces peucetius var. caesius*. Механизм действия антибиотика обусловлен способностью взаимодействовать с ДНК и препятствовать синтезу

нуклеиновых кислот. Доксорубин снижает митотическую активность, вызывает хромосомные абберации, оказывает выраженное иммунодепрессивное действие; высокоактивен в отношении многих форм опухолей; обладает иммуносупрессивной активностью, кардиотоксичностью, угнетает кроветворение. Наиболее *серьезными побочными эффектами доксорубина, ограничивающими его дозу*, являются кардиотоксичность и миелосупрессивное действие. Трудно корректируемая кардиотоксичность чаще всего проявляется у больных при достижении суммарной дозы доксорубина, превышающей 550 мг/м². Миелосупрессия, которая проявляется, прежде всего, лейкопенией и тромбоцитопенией, наступает обычно на 10–14 день после начала химиотерапии.

Создание липосомальных форм доксорубина прежде всего было необходимо для снижения токсических свойств антибиотика и возможности увеличения используемого количества препарата, что в свою очередь повышает эффективность химиотерапии онкологических больных.

На рис. 10 показана химическая структура доксорубина и идарубина.

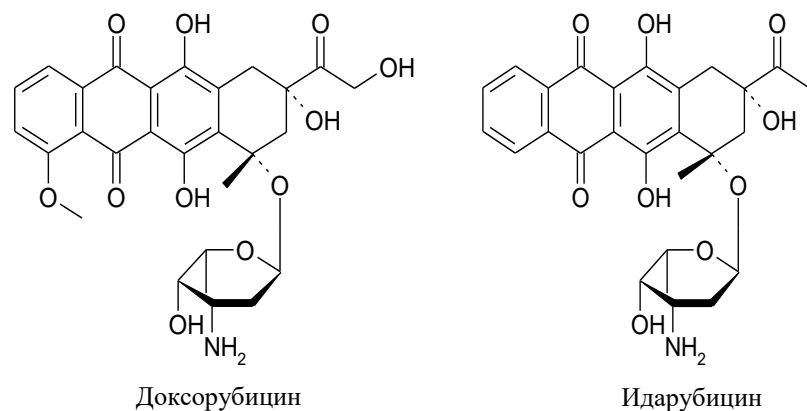


Рисунок 10 – Химическая структура доксорубина и идарубина

Сегодня на мировом фармацевтическом рынке широко представлены липосомальные формы антрациклинов, отличающиеся по содержанию включенного антибиотика, размеру и составу липосом: «Daune-Home», NeXstar Pharmaceuticals, (США); «Doxil», Alza Pharmaceuticals, (США); «Cueyx», Schering-Plough, (Бельгия); «Липодокс», Биолек, (Украина); «Myocet», Elan Pharma, (США) (см. табл. 2).

«Doxil» – первый из липосомальных препаратов, содержащих доксорубин; представляет липосомы, состоящие из фосфатидилхолина, холестерина и стерического стабилизатора (конъюгата) дипальмитоилфосфатидилэтаноламина с полиэтиленгликолем-2000, размером 80–120 нм (STEALTH-липосомы).

«Cueyx» и «Липодокс» получены из яичного высокоочищенного фосфатидилхолина, размером в диаметре около 150 нм.

«Myocet» – доксорубин-цитратный комплекс, размером около 120–150 нм в диаметре.

В Украине сегодня зарегистрированы две формы липосомального доксорубина: с 1998 года препарат «Липодокс» и с 2006 года препарат «Cueyx», представляющий собой STEALTH-липосомы.

Указанные липосомальные препараты обладают высокой противоопухолевой и противолейкозной активностью, обеспечивая свободное высвобождение доксорубина из липосом и распределение из крови в ткани и органы, вследствие чего уменьшается токсичность антибиотика. Препараты отличаются значительно меньшей кардиотоксичностью, миело- и иммуносупрессией по сравнению со свободной формой доксорубина, а также проявление пролонгированного действия. Липосомальные препараты применяются для лечения саркомы мягких тканей, рака молочной железы и легких, рака щитовидной и поджелудочной желез, рака почек, яичников, тела матки и др. Выявлено два главных дозозащитных фактора: стоматит и кожная токсичность (подошвенно-ладонная дисэстезия или Hand-Foot syndrome), причем, в большей степени это касается STEALTH-липосом. При использовании липосомальных препаратов обнаружено снижение общих тяжелых токсических реакций – тошноты, рвоты, алопеции и др. Включение препарата Липодокс в схемы лечения больных с неходжкинскими лимфомами и лимфогранулезом предоставляет следующие возможности: повышение противоопухоле-

вого эффекта; обеспечение пролонгированного действия, что способствует более длительной ремиссии; обуславливает высокую эффективность полихимиотерапии у больных, которые ранее многократно проходили лечение и имеют лекарственную резистентность по типу множественной лекарственной резистентности, снижение кардиотоксичности и гематотоксичности химиотерапии с применением антрациклиновых антибиотиков; позволяет полностью выполнить программу терапии у ослабленных и длительное время леченных больных; применять схемы лечения, включающие доксорубин у больных пожилого возраста с нарушением сердечной деятельности. Доклинические данные убедительно доказали, что при использовании липосом с доксорубином его содержание в миокарде животных при различных моделях опухолей и контрольных животных на 30–100 % меньше, чем при введении свободного антибиотика. При этом продолжительность жизни, например, при асцитной опухоли Эрлиха в 1,6 раз больше. Последнее, по видимому, может объяснить снижение токсичности липосомальной формы доксорубина, в частности, кардиотоксичности.

Эффективность клинического применения липосомальных форм цитостатиков изучалась в Украине на базе ведущих профильных организаций: Медицинской академии последипломного образования (г. Харьков); Института экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины (г. Киев); Областном клиническом онкологическом диспансере (г. Харьков).

Возможность клинического применения липосомальных форм цитостатиков изучена нами впервые на больных распространенным раком органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), пролеченных в хирургическом и химиотерапевтическом отделениях Харьковского областного клинического онкологического диспансера в период с 1991 по 1998 годы.

Использовалась известная схема FAP при раке желудочно-кишечного тракта, модифицированная путем увеличения разовых доз и изменения режима введения липосомальных препаратов:

- 1-й день – 5-фторурацил 1000 мг/м^2 + доксорубин 60 мг/м^2 ;
- 2–4-й дни – 5-фторурацил по 1500 мг/м^2 ;
- 5-й день – 5-фторурацил 1000 мг/м^2 + цисплатин 120 мг/м^2 .

Химиотерапия проводилась методом инфузии препаратов с помощью дозаторной техники (аппарат ДЛВ-1) через постоянный катетер, установленный в верхнюю полую вену при системной химиотерапии и в приводящую артерию опухоли или в брюшную полость при регионарном введении. Курсы химиотерапии проводились с интервалом 3–4 недели, до 4–6 курсов в течение 1 года у каждого пациента.

Использование липосом позволило нам увеличить концентрацию цитостатиков в крови в 1,5–3,0 раза для доксорубина и в 2 раза для фторурацила по сравнению с их свободными формами. Введение цитостатиков в липосомальной форме приводит к повышенному накоплению препаратов в ткани опухоли, как в их свободной форме, так и при регионарном внутриартериальном введении. Изучение процессов перекисного окисления липидов показало, что липосомы приводят к уменьшению концентрации в крови малонового диальдегида. Объективным критерием улучшения общей иммунной реактивности является снижение уровней опухолевых специфических маркеров крови СЕА и СА в 1,5 и 1,2 раза соответственно после каждого курса химиотерапии с использованием липосом. Тошнота и рвота при использовании липосомальных форм цитостатиков были непродолжительными и не требовали фармакологической коррекции. При традиционном введении цитостатиков в свободной форме побочные эффекты, наряду с их частотой, отличались большей токсичностью по сравнению с липосомальными формами препаратов.

При внутривенном введении липосомальных форм цитостатиков (доксорубин, фторурацил, цисплатин) выявлен выраженный лекарственный патоморфоз высокодифференцированной аденокарциномы. Обнаружены поля резко дистрофичных клеток, участки некроза паренхимы опухоли. На ультраструктурном уровне наблюдалось разрушение структуры раковых комплексов и опухолевых клеток. При внутриартериальном введении обнаружена значительная, в части случаев полная регрессия высокодифференцированной аденокарциномы.

При изучении распределения доксорубина, введенного в составе препарата «Липодокс» и в свободной форме мы получили несколько неожиданные результаты. Установлено, что введение доксорубина в свободной форме не приводит к накоплению антибиотика в головном мозге лабораторных животных, а введение препарата «Липодокс» позволяет обнаружить док-

сорубицин в мозговой ткани. Вероятно, препараты липосом с размером около 160 нм и менее способны проникать через гематоэнцефалический барьер, в то время как большинство химиотерапевтических препаратов не проникает через гематоэнцефалический барьер. Эти данные нашли подтверждение и в работах других авторов. В доклинических исследованиях на крысах было показано, что содержание доксорубицина после введения липосомальной пегилированной формы в имплантированной опухоли мозга была в 14 раз выше по сравнению с таковой после введения доксорубицина в свободной форме. Полученные данные дают основание предположить возможность лечения опухолей центральной нервной системы, например, глиобластомы или терапии больных с метастазами в головной мозг, используя липосомальные формы доксорубицина.

Проведены клинические исследования с участием 50 больных лимфогранулематозом и неходжкинскими лимфомами. Схемы полихимиотерапии 30 больных основной группы включали доксорубицин в липосомальной форме («Липодокс»), а 20 больным контрольной группы вводили свободную форму доксорубицина. Больным вводили препараты по известной схеме (винкристин – в дозе 2 мг, доксорубицин в одной из форм 35 мг/м², циклофосфамид – в дозе 600 мг/м², преднизолон – в дозе 40 мг/м²). Проведение полихимиотерапии у больных основной группы с применением «Липодокса» продемонстрировало 100 % клиническую эффективность. К окончанию второго курса химиотерапии у всех пациентов лимфатические узлы уменьшились на 70–90 %. Явления общей интоксикации опухолевого генеза у всех больных были полностью устранены на период окончания первого курса лечения. Продолжительность курса химиотерапии по указанной схеме с использованием липосомальной формы доксорубицина существенно превышала таковую при использовании свободного препарата и обеспечила возможность успешно завершить программу первичного радикального либо противорецидивного лечения и достичь ремиссии. Применение «Липодокса» обеспечивало непрерывную устойчивую положительную динамику регрессии лимфатических узлов и позволяла достичь ремиссии даже при рефрактерных формах. Установлено, что у всех первичных больных основной группы достигнуто состояние полной ремиссии, в то время как в контрольной группе ремиссия достигнута у 19 больных, однако у 2-х пациентов зарегистрирова-

ны ранние рецидивы в течение первого года и у 1 больного – прогрессирование процесса на фоне лечения. Клинические наблюдения подтверждают относительно низкий уровень токсичности липосомальной формы доксорубицина, что позволило применять «Липодокс» у больных на фоне выраженных явлений общей интоксикации как опухолевого генеза, так и связанной с сопутствующей патологией. Степень проявления кардиотоксичности и миелосупрессии при использовании «Липодокса» была менее выражена. Установлено, что статистически достоверных изменений ни одного из биохимических показателей сыворотки крови после проведения курса полихимиотерапии у больных обеих групп не выявлено. Исследователи пришли к выводу, что по эффективности «Липодокс» в ряде клинических ситуаций превосходит препарат свободного доксорубицина в частности, при резистентных к лечению и агрессивных формах злокачественных лимфом; при истинных рецидивах, развившихся в зоне выраженных фиброзных изменений. Снижение побочных эффектов (миелосупрессия, гематологическая токсичность, кардиотоксичность) при использовании «Липодокса» позволило рекомендовать препарат в схемы лечения больных лимфогранулематозом и неходжкинскими лимфомами. «Липодокс» хорошо зарекомендовал себя у больных пожилого возраста с нарушениями сердечной деятельности. За счет небольшого диаметра (150 ± 40 нм) липосомы «Липодокса» проникают через стенки капилляров, питающих опухоль, проницаемость которых повышена. После проникновения липосомы в опухоль происходит разрушение липосомальной мембраны и высвобождение антрациклинового антибиотика – доксорубицина.

При сравнении эффективности и безопасности использования свободной и липосомальной формы доксорубицина («Липодокс») установлено, что липосомальная форма по многим параметрам превосходит свободную. Так, при более пролонгированном действии уровень гепато- и нефротоксичности «Липодокса» ниже, что позволяет уменьшить спектр противопоказаний к использованию последнего. Липосомальная форма позволяет проникать молекулам препарата непосредственно в опухоль. Медленное высвобождение молекул доксорубицина из липосом позволяет избежать возникновения пиковой концентрации препарата в плазме крови, что благоприятно сказывается на профиле безопасности.

За 2001–2005 гг. проведен анализ лечения 96 больных раком молочной железы различных стадий. Диапазон возраста составил 26–70 лет. Неoadъювантная химиотерапия в основной группе у 64 больных проведена липосомальной формой доксорубицина («Липодокс») в дозе 30 мг/м² в 1-ый, 8-ой, 15-ый и 22-ой дни. В контрольной группе были 32 пациентки со стандартным режимом лечения, с интервалом 21 день, 4 цикла. Количество оперированных в основной группе составило 37,5 %, а в контрольной – 46,9 %. Добавление лучевой терапии увеличило число операций в основной группе еще на 50 %, а в контрольной – только на 9,4 %. Медиана выживаемости различалась в зависимости от размеров опухоли. В основной группе независимо от стадии T, если размер опухоли не превышал 3-х см, медиана выживаемости составляла 45 месяцев, при размере опухоли 3,1–5 см – 56 месяцев, при размере опухоли более 5 см – 34 месяца; в контрольной группе соответственно 31 месяц, 42 месяца и 31 месяц. Проведенные исследования продемонстрировали эффективность неoadъювантной химиотерапии липосомальной формой доксорубицина при местнораспространенном раке молочной железы.

При изучении влияния липосомального доксорубицина («Липодокс») на эффект лучевой терапии, предоперационная лучевая терапия проводилась через 21 день после окончания 4 курсов неoadъювантной химиотерапии и назначалась только при недостаточном положительном эффекте химиотерапии. Исследовалась эффективность лучевой терапии после проведения неoadъювантной химиотерапии в двух группах женщин, больных местнораспространенным раком молочной железы. При проведении радикальной программы телегамматерапии использовался метод обычного фракционирования с разовой облучаемой дозой 2 Гр, до суммарной очаговой дозы 40 Гр на область пораженной молочной железы и пути регионарного лимфатического оттока. Дополнительно, на опухолевые очаги дозы облучения доводились до 60 Гр уменьшенными полями. Первая группа состояла из 35 пациенток, получавших в схеме химиотерапии «Липодокс», а вторая группа из 13 пациенток, получавших перед лучевой терапией свободную форму доксорубицина. Эффективность лучевого лечения на 2-м этапе комплексного лечения позволила увеличить число хирургических вмешательств в первой группе в 91,4 % случаях, а во второй группе – 23,1 % случаев. Проведенные исследования продемонстрировали модифицирующее влияние неoadъювантной химиоте-

рапии липосомальной формой доксорубицина при местнораспространенном раке молочной железы.

«CueLux» – пегилированный липосомальный доксорубицин. Такая структура защищает липосомы от детекции моноклеарной фагоцитарной системы, что увеличивает продолжительность циркуляции препарата в крови. Показаниями к применению является лечение больных с метастазирующим раком молочной железы в случае существования повышенного риска со стороны сердечно-сосудистой системы, в том числе: метастатический рак молочной железы у женщин при наличии показаний терапии антрациклинами; метастатический рак молочной железы у женщин при неэффективности терапии таксанами. Препарат применяется для лечения прогрессирующего рака яичника у женщин, когда химиотерапия первой линии на основе соединений платины оказалась неэффективной; СПИД-ассоциированной саркомы Капоши у пациентов с низкими показателями CD4. Результаты радиоизотопного исследования и биопсии тканей свидетельствуют, что при использовании пегилированного липосомального доксорубицина антрациклиновый антибиотик преимущественно аккумулируется в опухолевой ткани. К побочным явлениям при использовании препарата «CueLux» можно отнести ладонно-подошвенную эритродизестезию (44–46 % случаев). В большинстве случаев её выраженность была незначительна; тяжелых случаев 17–19,5 %; случаев угрожающих жизни 1 %. Кроме того, наиболее распространенным побочным эффектом является угнетение функции костного мозга. Необходимо отметить, что применение в клинической практике препарата «Липодокс» не выявляло ладонно-подошвенной эритродизестезии. Риск развития кардиологических осложнений при использовании «CueLux» достоверно ниже, чем при назначении свободного доксорубицина. Гистологический анализ образцов биопсии миокарда показал, что в отличие от свободной формы доксорубицина, терапия «CueLux» (общая доза 469–860 мг/м²) сопровождается достоверно менее выраженным кардиотоксическим эффектом ($p < 0,015$).

При лечении больных раком молочной железы (19 больных) был использован липосомальный непегилированный доксорубицин «Myocet» в дозе 50–60 мг/м², доцетаксел в дозе 60–75 мг/м² и гемцитабин 350–400 мг/м². Лечение проводили каждые 3 недели, максимум 6 циклов. Лечение было эф-

фактивно и относительно безвредно, так как не было обнаружено проявлений кардио- и нейротоксичности.

Традиционные антрациклины редко используются при лечении больных раком головы и шеи. ПЭГ-липосомы с доксорубицином изучали в первой фазе как в монотерапии, так и в составе комбинированной химиотерапии. Поскольку результаты некоторых исследований были обнадеживающими, было решено провести несколько исследований по применению липосомального доксорубицина для лечения больных раком головы и шеи. Объединенные результаты таких исследований свидетельствуют, что ПЭГ-липосомы с доксорубицином обладают значительной эффективностью при лечении рака головы и шеи. В исследованиях также определена доза препарата, которая может эффективно и безопасно применяться в сочетании с лучевой терапией.

Эффективность применения липосомального пэгилированного доксорубицина установлена при лечении рецидивирующей или резистентной множественной миеломы. У больных прошедших курсы лечения общая выживаемость достигала до 15 месяцев, кардиотоксичность, нейтропения, алоpecia были выявлены в меньшей степени, чем при использовании свободной формы доксорубицина.

Липосомальные формы доксорубицина «Cuelyx», «Липодокс», «Муосет» и другие могут назначаться больным, имеющим прогностические факторы риска: развитие кардиологических осложнений на терапию свободными антрациклинами, лучевой терапии, адъювантной терапии, возраста, отягощенного кардиологическим анамнезом и т.д.

Появляются сообщения о высокой эффективности лечения опухолевых заболеваний комбинированной химиотерапией липосомальным доксорубицином, доцетакселом и моноклональными антителами. При раке молочной железы; при метастазированном раке молочной железы предложено использовать комбинацию липосомального доксорубицина и моноклональных антител (трастузумаб). Использование моноклональных антител позволяет блокировать функции экстрацеллюлярной части рецепторов факторов роста.

До появления таксанов комбинированные режимы, такие как циклофосфан, доксорубин и цисплатин, очень часто использовали для лечения больных. Использование доксорубицина уменьшилось после появления таксанов и винорельбина, что связано с их более благоприятным профилем ток-

сичности. Комбинированный режим, включающий в себя эпирубицин в высоких дозах и препараты платины, может быть таким же эффективным, как и монотерапия винорельбином. В связи с этим специалисты постоянно работают над вопросом создания липосомальных форм платины, таксанов, винорельбина и других препаратов цитостатиков.

При исследовании противоопухолевой эффективности митоксантрона на мышцах с опухолью аденокарциномы молочной железы Ca-755 установлено, что эффективность липосомальной формы митоксантрона в дозе 0,52 мг/кг составляет 93–100 % торможения роста опухоли и превышает противоопухолевое действие свободного митоксантрона в дозе 3,1 мг/кг при торможении роста опухоли 78–89 %. Более высокая эффективность липосомальной формы митоксантрона в сравнении с субстанцией подтверждена на экспериментальной модели лимфолейкоза P-388. Увеличение продолжительности жизни животных в дозе 1,6 мг/кг составило 259 % (липосомальная форма) и 194 % (свободная форма) и в дозе 0,52 мг/кг – 140 % и 79 %, соответственно. Авторам удалось снизить дозу митоксантрона в 6 раз, не теряя специфической активности липосомальной формы и повысить биодоступность препарата. При этом увеличение продолжительности жизни для липосомального митоксантрона с дозой 0,52 мг/кг составляло 105 %.

Антрациклиновые липосомальные антибиотики сегодня используются как при лечении опухолей по прямому назначению (монотерапия у больных с метастазирующим раком молочной железы, для лечения прогрессирующего рака яичника, для лечения СПИД-ассоциированной саркомы Капоши), так и для проведения клинических исследований при лечении опухолей желудочно-кишечного тракта, гепатомы, центральной нервной системы, почки, головы и шеи, злокачественных гинекологических новообразованиях, немелкоклеточного и мелкоклеточного рака легких и ряда других опухолей.

Препараты комплексных соединений платины

Препараты комплексных соединений платины относятся к наиболее широко применяемым цитостатическим средствам при злокачественных новообразованиях. В настоящее время наиболее широко применяемыми в клинической практике производными платины являются цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин. Действие соединений платины при лечении онкологиче-

ческих больных связано с повреждением ДНК опухолевой клетки, в результате чего формируются цисплатин-ДНК (аддукты), которые в свою очередь блокируют репликацию, транскрипцию и, как результат, клеточную пролиферацию. *Показаниями к применению препаратов платины являются следующие показания:* метастатические несеминомные опухоли яичка, распространенный рак яичников, мочевого пузыря, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак шейки матки, метастатическая карцинома молочной железы, рак легкого. *Побочные эффекты* наблюдаются со стороны мочевыделительной системы (кумулятивная, дозозависимая почечная недостаточность); системы кроветворения (гематологическая токсичность – лейкопения и тромбоцитопения); системы пищеварения (тошнота, рвота); центральной нервной системы (отток токсичность – шум в ушах, потеря слуха, периферические нейропатии).

Резистентность к препаратам платины приводит к снижению внутриклеточного накопления цитостатика, что обуславливает большое количество неудач в клинической практике. При этом увеличение дозы цитостатика неизбежно приводит к росту токсических эффектов (нефротоксичность, нейротоксичность, тошнота и рвота). *Именно резистентность и высокая токсичность комплексных соединений платины привели к многочисленным попыткам создания липосомальных форм различных соединений платины и их использования в эксперименте и клинике.*

Фирмой Liplasome Pharma (Дания) предложены оригинальные составы липосом, которые специфически распознаются и активно разрушаются активированными ферментами опухолевой ткани, например, такими как фосфолипаза А2. Это приводит к специфической для опухоли доставке противораковых препаратов и улучшению лечебного действия. Кроме того, под действием секреторной фосфолипазы А2 мембраны липосом разрушаются и одним из образуемых продуктов являются токсичные лизофосфолипиды. Новая, активируемая опухолью липосомальная структура позволяет осуществить внутриклеточный транспорт в раковую ткань высоких концентраций инкапсулированных противораковых препаратов, таких как цисплатин (предложены также образцы липосом для доксорубина, винкристина, доцетаксела и других препаратов). Эта форма специфична для опухоли лекарственного препарата особенно эффективна при нацеленном транспорте обычных химиотера-

певтических препаратов, зачастую мутагенных и чрезвычайно токсичных как для раковых, так и для здоровых тканей. Авторами предложено вводить в состав липосом не только препараты цитостатиков, но и вещества нового класса – пролекарства липидной природы, которые под действием фосфолипазы А2 превращаются в противоопухолевые агенты. В свою очередь биодеградируемые липидные конъюгаты лекарств (липофильные пролекарства) обладают улучшенной фармакокинетикой.

Проведены комплексные исследования липосомального препарата платины («Липоплат») в сравнении с препаратом цисплатина фирмы «Эбеве». Определение параметров острой токсичности препаратов проводили их внутрибрюшинным введением мышам. Для изучения противоопухолевой активности использовали две модели экспериментального опухолевого роста: саркому 180 и саркому 45. Согласно полученным данным максимальной дозой, при которой все мыши остаются живыми является: для препарата фирмы «Эбеве» 7,5 мг/кг и для «Липоплата» 10,0 мг/кг. Минимальная доза, которая вызывала гибель 60 % мышей, составляла 10 мг/кг – для препарата фирмы «Эбеве» и гибель 40 % мышей составляла 20 мг/кг – для «Липоплата»; 100 %-ую гибель животных вызывала доза 30 мг/кг для препарата сравнения и 50 мг/кг для «Липоплата». Расчет LD₅₀ для обоих препаратов составил 29,91 мг/кг для «Липоплата» и 13,62 мг/кг для препарата фирмы «Эбеве». Также было проведено изучение массы тела, клинических признаков токсичности, масса внутренних органов и их микроскопическое изучение. При изучении противоопухолевой активности установлено, что показатели снижения роста опухоли при использовании «Липоплата» и препарата сравнения идентичны для штамма саркомы 45. На устойчивом к производным платины штамме саркомы 180 отмечена противоопухолевая активность двух форм препаратов платины, причем у «Липоплата» она была выше (39,6 %), чем у препарата сравнения (13,5 %). Учитывая, что при близкой противоопухолевой активности, «Липоплат» обладает практически в два раза меньшей токсичностью по сравнению с препаратом сравнения, были проведены клинические испытания препарата липосомальной формы платины – препарата «Липоплат».

Клинические испытания препарата «Липоплат» были проведены на 60 больных раком яичников III–IV стадии, аденокарциноме, первичном раке или

рецидиве при сравнении с препаратом цисплатина в свободной форме. Лечение проводили по общепринятой комбинированной схеме препаратов платины и циклофосфана. Установлена достаточно высокая эффективность «Липоплата» в исследуемой группе больных: у 46,6 % – полные или частичные ремиссии, у 43,4 % – стабилизация опухолевого процесса. Итого 90 % в сравнении с эффективностью цисплатина (у цисплатина 40,0 % и 30,0 % соответственно, всего 70 %). В исследуемых группах обращает на себя внимание большая разница прогрессирования заболевания: при использовании «Липоплата» – у трех больных, что составляет 10 %, а при использовании препарата сравнения – у 9-ти больных, что составляет 30 %. У больных контрольной группы с прогрессирующим процессом после проведения курса цисплатина через 2 месяца было проведено лечение «Липоплатом» в аналогичной дозе и режиме. Обнаружены следующие результаты: частичная ремиссия у 6-ти больных; стабилизация у 2-х больных; дальнейшее прогрессирование процесса у 1 больной с метастазами в печень. Необходимо отметить, что срок позитивной динамики опухолевого процесса после лечения «Липоплатом» у этих больных находился в пределах от 2 до 8 месяцев (в среднем $4,5 \pm 1,88$ месяцев). Повторный курс лечения цисплатином (по 2 курса) у 2-х больных после получения частичной ремиссии к «Липоплату» снова привело к прогрессированию болезни. Повторное проведение на этом негативном фоне 2-х курсов «Липоплата» обеспечивает стабилизацию опухолевого процесса. Таким образом, *при проведении клинических испытаний было установлено, что при резистентности к свободной форме цисплатина, использование липосомальной формы может гарантировать позитивный эффект.*

За прошедшее время были предложены различные способы получения липосом, содержащих соединения платины (цисплатин) из синтетических фосфолипидов – димиристоилфосфатидилхолин и димиристоилфосфатидилглицерин в молярном соотношении (7 : 3).

Несомненно, ближайшим кандидатом для применения в клинической практике является препарат «Липоплатин».

«Липоплатин» представляет собой *препарат цисплатина в форме липосом*, полученных из дипальмитоилфосфатидилглицерина, соевого фосфатидилхолина, холестерина, стабилизированных метоксиполиэтиленгликольдистеароилфосфатидилэтаноламин (ПЭГ-2000). Диаметр липосом около

100 нм. В липосомальной композиции 8,9 % цисплатина и 91,1% липидов. Концентрация цисплатина в препарате 3 мг/мл. Установлена высокая степень инкапсуляции цисплатина в липосомы – 95–97 %. Параметрами, определяющими высокое включение цитостатика в липосомы, является концентрация этанола, значение pH, температура, ионная сила и ряд других параметров, разработанных авторами. На лабораторных животных в доклинических исследованиях была установлена высокая противоопухолевая активность и снижение токсических свойств по сравнению со свободной формой цисплатина. Сравнение «Липоплатина» и цисплатина *in vitro* в клеточных линиях, полученных от немелкоклеточного рака легкого, рака почки, а также от нормальных предшественников гемопоэтических клеток показало высокую токсичность «Липоплатина» на всех моделях опухолевых клеток и гораздо меньшую токсичность в нормальных клетках по сравнению со свободной формой цисплатина. Также установлена более высокая противоопухолевая активность липосомальной формы. Было показано, что внутрибрюшинное введение «Липоплатина» менее токсично по сравнению с внутривенным способом. В модельных экспериментах на мышах с карциномой Эрлиха изучена фармакокинетика «Липоплатина» и свободной формы цисплатина, меченных радиоактивной меткой. Установлено более длительное присутствие липосомальной формы в крови животных и в опухоли. Обнаружено накопление липосомального цисплатина в селезенке и печени и снижение накопления в почках животных. Учитывая высокую нефротоксичность цисплатина, полученные данные представляют особый интерес.

При изучении «Липоплатина» в клинике на больных раком желудка, рака толстой кишки и аденокарциномы были выявлены незначительные проявления нефротоксичности и ототоксичности. Прямое измерение уровня платины в образцах из нормальных тканей и опухоли показало, что концентрация платины в опухолевой ткани в 10–50 раз больше, по сравнению с нормальной тканью, причем, в опухоли толстой кишки превышение концентрации достигало 200 раз по сравнению с нормальной тканью. Проведены исследования аэрозольной формы «Липоплатина» у больных раком легкого (17 пациентов). Пациенты 2 раза в день вдыхали аэрозоль. Результаты показали низкую токсичность, удовлетворительный терапевтический эффект и

переносимость липосомального препарата. У 12 пациентов отмечена стабилизация процесса после проведения курсов лечения.

После проведения I, II и III фазы клинического изучения «Липоплатина» на больных с различными формами опухолей, исследователи пришли к единому мнению:

- ✓ цитотоксичность «Липоплатина» существенно понижается по сравнению с цисплатином. В связи с этим могут быть увеличены концентрации препарата вводимого пациентам;

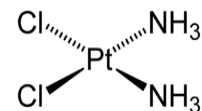
- ✓ цисплатин из препарата «Липоплатин» выделяется достаточно медленно, и платина находится в организме пациента длительный период, значительно превышающий нахождение в организме свободной формы цисплатина;

- ✓ за счет накопления платины преимущественно в опухолевой ткани, нормальные ткани организма менее повреждены.

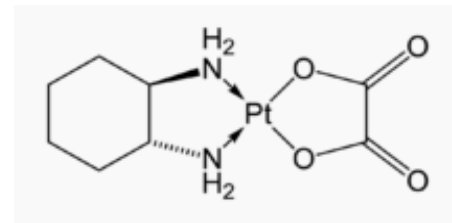
В настоящее время, еще один препарат платины («Lipoxal») – оксалиплатин проходит II фазу клинических испытаний на 27 пациентах с запущенными заболеваниями органов пищеварения – IV стадии рака желудочно-кишечного тракта: толстой кишки, желудка и поджелудочной железы. Пациентам вводили препарат в 6 дозах (100, 150, 200, 250, 300 и 350 мг/м²) 1 раз в неделю в течение 8 недель. Не выявлено никаких серьезных побочных эффектов при 4 дозах (100–250 мг/м²) в течение первых 4-х недель. На 5–6 неделю в этих же дозах начала появляться незначительная миелотоксичность и тошнота. Побочные эффекты в виде периферической нейропатии появились только на дозах 300–350 мг/м². Исследователи пришли к выводу, что побочные эффекты при использовании препарата «Lipoxal» значительно менее выражены, чем при использовании свободной формы оксалиплатина.

В связи с приведенными данными и учитывая, что препараты платины используются для лечения половины опухолевых заболеваний можно оценивать перспективу клинического использования липосомальных форм препаратов платины как достаточно высокую.

На рис. 11 приведена структура комплексных соединений платины.



Цисплатин



Оксалиплатин

Рисунок 11 – Структура комплексных соединений платины

Необходимо также отметить, что препараты платины сочетаются с лучевой терапией и с целым рядом цитостатических препаратов: гемцитабином, таксанами и препаратами растительного происхождения (Vinca-алкалоидами), которые также в настоящее время исследуются в липосомальной форме.

Препараты таксоидов

К препаратам таксоидов можно отнести доцетаксел и паклитаксел.

«Доцетаксел» – полусинтетическое средство группы таксоидов, которое получают из биомассы игл тиса. Способствует накоплению тубулина в микротрубочках и препятствует их распаду, что вызывает нарушение фазы митоза и межфазных процессов в опухолевых клетках. Показаниями к его применению является: местнопрогрессирующий или метастазирующий рак молочной железы; местнопрогрессирующий или метастазирующий рак легких; метастазирующая карцинома яичника. В качестве побочных эффектов можно отметить: нейтропению, тромбоцитопению, стоматит, рвоту, тошноту, алопецию, диарею, артериальную гипертензию, задержку жидкости в организме, отеки. Субстанция доцетаксела практически нерастворима в воде. Готовый препарат представляет собой концентрат, содержащий полисорбат-80 и этиловый спирт. Учитывая липофильность субстанции и её высокую токсичность было предложено использование липосомальной формы доцетаксела. Для получения липосомы использовали природный фосфатидилхолин, а в качестве минорных компонентов: фосфатидилинозит, дифосфатидилглицерин и фосфатидилсерин в количествах, не превышающих 5–10 %. Липосомы

получали методом ультразвуковой дезинтеграции или методом экструзии. Полученные препараты липосом оценивали по включению цитостатика, размеру частиц, степени окисленности, стабильности при хранении и медико-биологическим свойствам. Проведено определение LD₅₀ свободной и липосомальной формы доцетаксела.

«Паклитаксел» – препарат растительного происхождения. Вызывает необратимую полимеризацию белков микротрубочек клеточной цитоплазмы, в результате чего нарушается динамическое равновесие процесса «полимеризация – деполимеризация», обеспечивающего нормальное функционирование внутриклеточных структур в течение всего жизненного цикла клетки. «Паклитаксел» индуцирует образование и накопление аномальных сборок – «пучков» микротрубочек во время митоза, что приводит к остановке жизненного цикла клетки. *Показаниями к его применению* является: немелкоклеточный рак легкого у больных, которым не показано радикальное хирургическое лечение и / или лучевая терапия; распространенная форма карциномы яичника; метастазирующая карцинома молочной железы при неэффективности стандартной терапии. *В качестве побочных эффектов* можно отметить: миелосупрессию (выраженная нейтропения, тромбоцитопения, анемия); аллергические реакции; артериальную гипотензию; периферическую нейропатию; алопецию; тошноту и рвоту и др. «Паклитаксел» обладает уникальным механизмом действия и широким спектром противораковой активности. Однако у паклитаксела крайне низкая растворимость в воде, что затрудняет подбор подходящих форм дозирования. В настоящее время «Паклитаксел» изготавливают и вводят в носитель, содержащем полиэтиоксилированное касторовое масло (Кремофор EL) и этанол в соотношении 1 : 1. Перед введением больным этот раствор разбавляют солевыми растворами (1 : 10). При этом стабильность разведенного раствора паклитаксела достаточно низкая и возможно выпадение его в осадок. Введение паклитаксела в липосомы позволяет значительно улучшить растворимость препарата, снизить токсичность: отсутствие кардиотоксичности, алопеции, невропатии, анафилактических проявлений и многих других эффектов. Кроме того, липосомальная форма паклитаксела оказывает значительное влияние на преодоление множественной лекарственной устойчивости в раковых клетках, которые подвергаются химиотерапии. Липосомы получены из яичного фосфатидилхолина, тетрамиристо-

ил кардиолипина, холестерина, паклитаксела и α-токоферола в соотношении 9 : 1,8 : 3 : 1 : 0,1, соответственно. Получение липосом осуществляют ультразвуковой обработкой.

Высокая токсичность таксоидов привела к попыткам создания липосомальных форм различных таксоидов и их использования в эксперименте и клинике.

На рис. 12 показана химическая структура паклитаксела и доцетаксела.

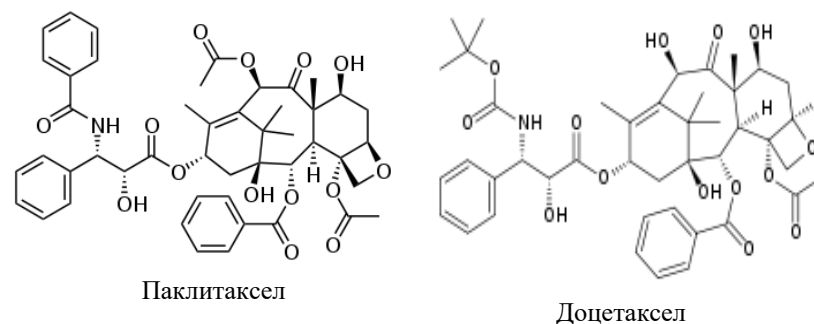


Рисунок 12 – Химическая структура паклитаксела и доцетаксела

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальным составом для липосом, обеспечивающим максимальное включение (около 100 %) и их стабильность при хранении является: фосфатидилхолин и дифосфатидилглицерин в соотношении 9 : 1. Определено оптимальное соотношение между фосфолипидами и гидрофобной субстанцией. Измерения размера частиц липосом проводили на приборе SALD-30IV при помощи программы Wing-1. Размер липосом, полученный методом ультразвуковой обработки, составил 120–180 нм, а методом экструзии – 80–140 нм. При изучении токсичности образцов при внутрибрюшинном и внутривенном введении мышам получены следующие результаты: LD₅₀ при внутрибрюшинном введении – 120 мг/кг для свободного цитостатика и 100 мг/кг для липосомальной формы; LD₅₀ при внутривенном введении – 80 мг/кг для свободного цитостатика и 180 мг/кг для липосомальной формы. Последнее может быть связано с различной фармакокинетикой двух форм, зависящей от пути введения животным. Учитывая, что в клинике данные препараты вводятся больным

внутривенно, эти данные представляют особый интерес. Так, по данным доклинического изучения свободный доцетаксел в терапевтической дозе угнетает рост основной опухоли карциномы Льюиса на 42–44 %, а липосомальная форма угнетает рост этой опухоли на 56 %, что достоверно больше, чем при использовании свободной формы. Внутрибрюшинное введение препаратов при карциноме Льюиса продемонстрировало большое снижение лейкоцитов при использовании липосомального препарата. При использовании мышей с лимфолейкозом L1210 липосомальная форма в меньшей степени влияла на лимфопоз (87,3 %) в отличие от свободной формы (92,3 %). При солидной карциноме Эрлиха угнетение роста опухоли обеими формами практически одинаково: 80–85 % – для свободной формы и 89 % – для липосомального образца.

Таким образом, использование наночастиц с размером около 80–140 нм, представляющих собой искусственные мембраны – липосомы, нагруженные гидрофобным цитостатиком доцетакселом представляют несомненный интерес для дальнейшего изучения. Кроме того, введение в практику препарата имеющего двойное действие – противоопухолевое и мембрано-протекторное позволяет улучшить качество лечения за счет снижения токсических проявлений.

В настоящее время во многих странах, в том числе и в Украине, проводятся многоцентровые клинические исследования липосомальной формы паклитаксела под названием «EndoTAG-1», MediGene AG (Германия). Препарат представляет собой липосомы, состоящие из N-{1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl}-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP) и 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl choline (DOPC), с включенным паклитакселом в соотношении (50 : 47 : 3) мол %. Препарат, положительно заряженный липосомами, избирательно действует на отрицательно заряженные эндотелиальные клетки и препятствует образованию новых кровеносных сосудов, питающих опухоль, что в свою очередь тормозит дальнейший рост опухоли. Препарат представляет лиофилизированные липосомы со средним диаметром около 200 нм.

Технология получения «EndoTAG-1» сводится к следующему:

- DOTAP, DOPC и паклитаксел в установленных концентрациях растворяют в этиловом спирте;
- получают мультиламеллярные липосомы в водном растворе трегалозы или мальтозы;
- подвергают экструзии и стерилизующей фильтрации;
- подвергают лиофилизации и разливу во флаконы.

«EndoTAG-1» использовали совместно с препаратом «Gemzar» (гемцитабин) для лечения рака поджелудочной железы. Исследования проводили в течение года, в котором приняли участие 200 пациентов с аденокарциномой поджелудочной железы. Данные, полученные при исследовании препарата, вселяют оптимизм. Так, при использовании монотерапии с препаратом «Gemzar» 12-ти месячная выживаемость больных составила 17 %. Среди пациентов, леченных двумя препаратами, выживаемость зависела от дозы вводимого «EndoTAG-1»: при низкой дозе 12-ти месячная выживаемость больных составила 22 %, при средней дозе – 36 %, при высокой дозе – 33 %. При продолжении лечения 12-ти месячная выживаемость составила: при низкой дозе – 25 %, при средней дозе – 52 %, при высокой дозе – 40 %. Было установлено, что применение липосомальной формы паклитаксела и гемцитабина практически вдвое увеличивало выживаемость пациентов по сравнению с традиционной химиотерапией (13,6 месяцев по сравнению с 7,2 месяца). Учитывая, что рак поджелудочной железы является одним из самых высоких по уровню смертности, полученные данные обнадеживают. Кроме того, весьма интересны данные полученные на крысах с моделью экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита при изучении избирательности попадания в спинной мозг положительно и отрицательно заряженных липосом. При внутривенном введении в хвостовую вену животным двух видов липосом, накопление в спинном мозге было отмечено только для катионных, а не анионных липосом, причем, только у животных с экспериментальной моделью склероза. У контрольных здоровых животных не было обнаружено присутствие липосом в спинном мозге.

С 2007 года начат второй этап исследования «EndoTAG-1» для лечения рака молочной железы. Первые результаты были к концу 2009 года, а окончательные результаты в 2010 году. С использованием липосомальной формы

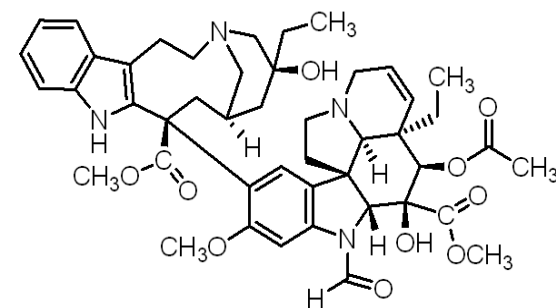
паклитаксела проведены исследования по лечению экспериментальных моделей рака простаты у животных. Самцам крыс в правую заднюю ногу вводили опухолевые клетки линии 106 MatLu. После роста опухоли животным на 12, 14, 16 и 19 день вводили липосомальный паклитаксел (EndoTAG-1) и в качестве контроля (сравнения) вводили свободный паклитаксел, катионные липосомы и глюкозу. После завершения лечения животных проводили измерения объема опухолей. Обнаружено, что объем опухоли после лечения липосомальной формой паклитаксела составлял $(2,49 \pm 0,84) \text{ см}^3$, в то время как объем опухоли у контрольных животных составлял: при лечении свободным паклитакселом $(5,59 \pm 0,45) \text{ см}^3$; глюкозой $(5,17 \pm 1,7) \text{ см}^3$; катионными липосомами $(3,87 \pm 1,25) \text{ см}^3$. Полученные данные продемонстрировали явные преимущества лечения рака простаты липосомальной формой паклитаксела по сравнению с лечением традиционными методами.

Препараты растительного происхождения

1. Препараты ВИНКРИСТИНА

«Винкрестин» – противоопухолевое цитостатическое средство растительного происхождения. Винкрестина сульфат является солью алколоида, экстрагированного из лекарственного растения барвинок розовый (*Vinca rosea* L). «Винкрестин» блокирует митотическое деление клеток на стадии метафазы путем денатурации тубулина. Показаниями к его применению являются: острые лейкозы, лимфогранулематоз, неходжкинские лимфомы, рабдомиосаркомы, нейробластомы, рак шейки матки, мелкоклеточный рак легких, рак молочной железы, саркома Юнга и ряд других опухолей. В качестве побочных эффектов можно отметить: паралитическую непроходимость кишечника, возможность судорог, язвенно-некротические поражения пищеварительного тракта, гранулоцитопению, анемию и тромбоцитопению, временную потерю зрения, лихорадку, головную боль, алопецию, приступы одышки и др.

Высокая токсичность «Винкрестина», сопровождающая химиотерапию побочными действиями, привела к созданию липосомальных форм данного алколоида. Созданием липосомальной формы «Винкрестина» занимаются специалисты ряда стран около 20 лет. На рис. 13 представлена химическая структура винкрестина.



Винкрестин

Рисунок 13 – Химическая структура винкрестина

Предложены различные составы липосом, содержащих винкрестин: яичный фосфатидилхолин : холестерин (55 : 45); дистеароилфосфатидилхолин : холестерин (55 : 45). Соотношение винкрестин : липиды – 0,2 : 1. Обе формы демонстрировали практически одинаковые свойства. В экспериментах на животных установлено, что время пребывания липосомальной формы винкрестина в плазме крови выше, чем у свободного винкрестина. При исследовании токсичности препаратов обнаружено, что липосомальные формы значительно менее токсичны, чем свободная форма винкрестина. Так LD_{50} свободной формы составляло 1,9 мг/кг, в то время как у липосомальной формы – 4,8 мг/кг. Противоопухолевая активность липосомальных форм винкрестина в модельных экспериментах на опухолях (L1210 и P388) также превосходила противоопухолевую активность свободной формы винкрестина.

Препарат VSLI (onco TCS) – липосомальная форма винкрестина (0,16 мг/мл). При его исследовании обнаружено продление циркуляции винкрестина в кровотоке и большее накопление в опухолевых тканях. Липосомальная форма использует преимущество пористости капиллярных сосудов опухоли, способствующее накоплению препарата в очагах опухоли и позволяет пролонгировать выведение препарата. Липосомы, размером около 120 нм были получены из дистеароилфосфатидилхолина и холестерина. Проведено изучение эффективных доз винкрестина, изучена фармакокинетика и токсические свойства липосомальной формы при сравнении со свободной

формой винкристина. Установлена невысокая гематологическая токсичность. Доза липосомального винкристина составляет 2 мг/м^2 , в отличие от $1,4 \text{ мг/м}^2$ для свободной формы винкристина, что также свидетельствует о снижении токсичности так как при использовании более высоких доз не обнаружено увеличения побочных эффектов. Кроме того, липосомальная форма винкристина не нацелена на нормальные ткани пациентов. Препарат прошел III фазу клинических испытаний при лечении неходжкинской лимфомы. Начаты клинические испытания препарата VSLI у больных раком легких и острой лимфобластической лейкемией. Авторами установлено, что скорость выхода винкристина из липосом прежде всего зависит от соотношения винкристина и липидов. С целью создания оптимальной терапевтической концентрации цитостатика в организме и учитывая необходимость постепенного снижения высвобождения лекарственного средства из липосомы, авторами предложено регулировать скорость выхода винкристина из липосом за счет подбора соотношения винкристин : липиды.

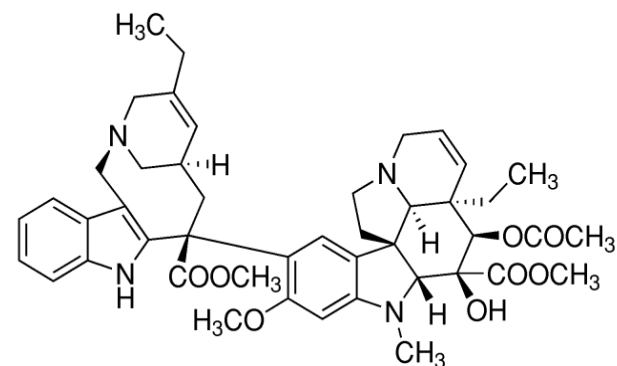
Эффективность применения в клинике на больных с метастазирующей меланомой (12 пациентов) установлена для липосом, полученных из яичного сфингомиелина и холестерина в молярном соотношении 58 : 42. Препарат вводили внутривенно в течение 1 часа в дозе 2 мг/м^2 каждые 2 недели (1 цикл). Нахождение винкристина в плазме обнаруживалось в течение 12 часов, в то время как свободная форма находилась в плазме больных не более 3-х часов.

В Казахстане проводятся исследования по созданию противоопухолевого препарата «Арглабин», полученного из экстракта полыни гладкой. По своей цитостатической активности «Арглабин» превышает действие препаратов винкристина и винбластин. Одной из форм использования данного препарата является липосомальная форма на основе природных фосфолипидов.

Несомненный интерес представляют работы по получению *модифицированных липосом, содержащих винкристин*. В этих исследованиях показано, что липосомы, которые пространственно стабилизированы полиэтиленгликолем, содержат на своей поверхности конкурентный ингибитор рецептора (BAFF), находящийся на поверхности В-клеток злокачественных опухолей. Данный рецептор играет важную роль в поддержании нормального клеточ-

ного развития, и количество рецепторов значительно увеличивается в многочисленных В-клетках злокачественных опухолей. Обнаружено, что модифицированные липосомы с винкристином обладают более высоким уровнем цитотоксичности и могут быть использованы для лечения гематологических злокачественных заболеваний.

В настоящее время разрабатываются липосомальные лекарственные формы таких препаратов растительного происхождения как «Винорельбин» и «Винбластин». На рис 14 представлена химическая структура «Винорельбина».



Винорельбин

Рисунок 14 – Химическая структура винорельбина

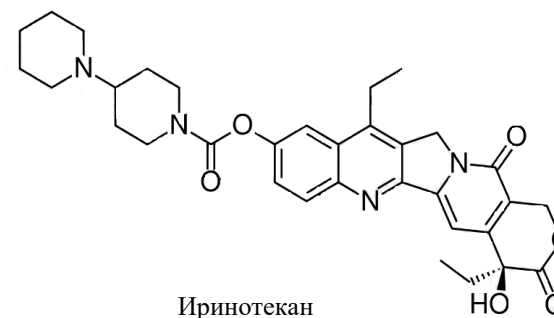
2. Препараты ИРИНОТЕКАНА

«Иринотекан» – полусинтетическое производное камптотецина (алколоида из листьев растения *Camptotheca acuminata*). Ингибируя фермент ДНК-топоизомеразу I, иринотекан и его активный метаболит SN-38 нарушают синтез ДНК в опухолевых клетках. Проявляет антибластомное действие и в тех случаях, когда предшествующая терапия антиметаболитами оказалась неэффективной. Обладает способностью блокировать ацетилхолинэстеразу.

Показаниями к применению является прогрессирующий колоректальный рак.

В качестве побочных эффектов можно отметить: обратимую нейтропению, анемию, одышку, тромбоцитопению, судороги, астению, рвоту, тошноту, озноб, диарею, общее недомогание, боль в животе и другие явления.

Липосомы, содержащие «Иринотекан» (СРТ-11) обладают выраженной противоопухолевой активностью против карциномы легких. При сравнении выживаемости мышей с привитой карциномой легких Льюиса среднее количество дней в контрольной группе животных леченных свободным препаратом составила 23 дня, в то время как использование «Иринотекана», включенного в липосомы приводило к продолжительности жизни 28,5 – 30 дней. В этих же исследованиях не обнаружено различий в результатах при использовании липосомальных препаратов и липосомальных препаратов, содержащих ПЭГ. Интересен тот факт, что количество СРТ-11, превращенного в SN-38 в опухолевых клетках выше в группе животных, получавших липосомы, чем в группе животных получавших свободный СРТ-11. Иринотекан гидрохлорид – пролекарство, которое превращается в SN-38-активный метаболит с высоким противоопухолевым действием. Аналогичные данные получены при использовании в качестве модели перевиваемую карциному Эрлиха и на модели колотеральной карциномы. При проведении исследований обнаружена длительная циркуляция липосом, нагруженных иринотеканом. Выживаемость животных леченных липосомальным препаратом иринотекана в дозе 50 мг/кг составляла 34 дня, в то время как при использовании свободной формы препарата только 22 дня. Липосомальный препарат представлял собой иринотекан, инкапсулированный 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин и холестерин в молярном соотношении (55 : 45). Рядом авторов для получения липосомальных композиций, содержащих иринотекан, рекомендовано использовать такие липиды как фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, дипальмитоилфосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин, холестерин в различных соотношениях. Обязательным липидным компонентом в любом составе липосомальных препаратов авторы предлагают использовать кардиолипин. На рис. 15 показана химическая структура «Иринотекана».

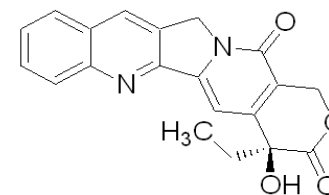


Иринотекан

Рисунок 15 – Химическая структура иринотекана

3. Препараты КАМПОТЕЦИНА

Несомненный интерес представляют данные полученные при изучении препарата «Endo-TAG-2» MediGene AG (Германия). Препарат представляет собой липосомы, состоящие из N-{1-(2,3-Dioleoyloxy) propyl} – N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTAP) – 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl choline (DOPC), с включенным в липосомы камптотецином в соотношении (50 : 47 : 3) мол %. Исследования проводили на мышах C57/Bl6 с перевитой метастазирующей человеческой опухолью поджелудочной железы. По сравнению с контрольной группой показано высокое противоопухолевое действие «Endo-TAG-2». Установлено значительное снижение плотности микрососудов в модельных опухолях, в том числе и в карциноме легких Льюиса – до 50 %. Установлен значительно больший противоопухолевый эффект липосомальной формы камптотецина по сравнению со свободной формой противоопухолевого препарата. На рис. 16 представлена химическая структура камптотецина.



Камптотецин

Рисунок 16 – Химическая структура камптотецина

4. Препараты ЦИТАРАБИНА

«Цитарабин» – противоопухолевое средство группы антиметаболитов (аналогов пиримидина). Нарушает синтез ДНК, ингибирует ДНК-полимеразу. Кроме того, по-видимому, частично встраивается в РНК и ДНК.

Показаниями к применению являются: острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, бластный криз при хроническом миелоидном лейкозе, неходжкинские лимфомы высокой степени злокачественности.

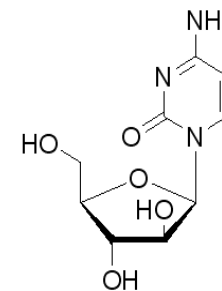
В качестве побочных эффектов можно отметить: миелосупрессию, тромбоцитопению, лейкопению, анемию, подавление иммунитета, стоматит, нарушение функции печени, тромбоз, флебит. Цитарабиновый синдром характеризуется лихорадкой, мышечной болью, конъюнктивитом, недомоганием.

В 2007 году на мировом фармацевтическом рынке появился новый коммерческий липосомальный препарат «ДероСут», в котором в качестве лекарственной субстанции используется цитарабин. «ДероСут» представляет собой жидкий препарат с концентрацией цитарабина 10 мг/мл. Липосомы получены из холестерина (4,1 мг/мл), триолеина (1,2 мг/мл), диолеилфосфатидилхолина (5,7 мг/мл), дипальмитоилфосфатидилглицерина (1,0 мг/мл). Препарат изучен на всех фазах доклинического и клинического исследования и рекомендован для лечения лимфоматозного менингита, опухолей мозга у взрослых и детей. «ДероСут», как правило, хорошо переносится. Наблюдаются единичные побочные эффекты: арахноидит, головная боль, тошнота. Вводится препарат интратекально. *Преимуществом препарата* является медленное высвобождение цитарабина из липосом и пролонгированное поддержание терапевтической концентрации цитарабина в спинномозговой жидкости. Это позволило уменьшить количество вводимого препарата и сократить количество инъекций. Период полувыведения липосомального цитарабина составляет 56,7 часов, в то время как период полувыведения свободной формы цитарабина – 32,7 часа.

Достигнутая медиана времени до прогрессирования у липосомальной формы составляет 77 дней, а у свободной формы цитарабина только 48 дней. Низкая токсичность «ДероСут» позволила увеличить дозу вводимого цитарабина. После проведения клинического изучения «ДероСут» на больных с различными формами опухолей, исследователи пришли к следующему мнению: цитотоксичность «ДероСут» существенно понижается по сравнению со сво-

бодной формой цитарабина. В связи с этим могут быть увеличены концентрации препарата вводимого пациентам. Цитарабин из препарата «ДероСут» выделяется достаточно медленно и цитостатик находится в организме пациента длительный период, значительно превышающий нахождение в организме свободной формы препарата, за счет накопления цитарабина преимущественно в опухолевой ткани. Нормальные ткани организма при введении липосомальной формы препарата больным менее повреждены.

На рис. 17 приведена химическая структура цитарабина.



Цитарабин

Рисунок 17 – Химическая структура цитарабина

Липосомальные формы препаратов в фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия опухолевых тканей основана на введении в организм фотосенсибилизаторов. При последующем световом, например, лазерном облучении патологического участка ткани, накопившиеся в нем молекулы фотосенсибилизатора, катализируют образование цитотоксических продуктов, в частности, молекул синглетного кислорода, разрушающих опухолевые клетки.

Несомненный интерес представляют данные *по использованию порфиринов для фотодинамической терапии* или диагностики опухолевых клеток. Использование порфиринов ограничивается низким уровнем избирательности. Использование липосом, содержащих порфирины позволяет увеличить селективность для опухоли. Предложен оптимальный состав липосом и установлено, что липофильные порфирины проявляют большую селективность. Установлено, что *оптимальным является бензопорфирин*. В состав липосом

вводили димиристоилфосфатидилхолин (1,41 %), яичный фосфатидилглицерин (1,0 %) или соевый фосфатидилхолин (2,9 %), лактозу или трегалозу (10,0 %), аскорбилпальмитат (0,0025 %), бутилгидрокситолуол (0,0003 %), воду для инъекций. Содержание бензопорфирина в составе липосом 0,2–0,4 %. Получены эффективные препараты липосом, содержащие фотосенсибилизатор, имеющий максимум поглощения света при 620–690 нм.

Предложена липосомальная композиция с размером липосом 190 ± 10 нм, состоящая из природного лецитина, холестерина и в качестве фотосенсибилизатора используется сульфанированный фталоцианин оксиалюминия в соотношениях 2 : 1 : 0,2. Использование липосом позволяет проводить противоопухолевую терапию.

«Визудин» – липосомальная форма *вертепорфирина*. В состав препарата на один флакон входит: вертепорфирин – 15 мг, димиристоилфосфатидилхолин – 70,5 мг, фосфатидилглицерин яичного желтка – 48,75 мг, лактоза – 690 мг, аскорбилпальмитат – 0,15 мг, гидрокситолуол бутилированный – 0,015 мг. «Визудин» используется в офтальмологии для лечения больных преимущественно с классической субфовеальной хороидальной неоваскуляризацией, возникшей вследствие возрастной дегенерации сетчатки или патологической миопии. Липосомальные производные бензопорфина (вертепорфирин) являются светочувствительными красителями, проявляющими цитотоксичность за счет образования радикалов кислорода при активации (длина волны 689 нм). В составе ЛС вертепорфирин ориентирован на клетки опухолевого и неоваскулярные эндотелиальные сосуды. «Визудин» приводит к образованию цитотоксинов только при активации светом в присутствии кислорода. В результате образуется нестойкий с коротким периодом жизни синглетный кислород с высокой реакционной способностью. Синглетный кислород приводит к разрушению биологических структур, что в свою очередь способствует локальной окклюзии сосудов, разрушению клеток и их гибели. Селективность фотодинамической терапии при использовании липосомального вертепорфирина основана не только на локализованном влиянии света, но также и на селективном быстром захвате и удерживании вертепорфирина быстро пролиферирующими клетками, включая эндотелий хороидальной зоны неоваскуляризации. В экспериментах на животных с моделью неоваскуляризации в глазу, а также при клиническом использовании «Визудина»

установлено, что внутривенное введение липосом вертепорфирина с последующей обработкой светом лазера (длина волны 689 нм) приводит к селективной окклюзии сосудов зоны неоваскуляризации, при этом крупные нормальные сосуды оболочки глаза остаются открытыми. С помощью флуоресцентной ангиографии была подтверждена окклюзия сосудов зоны хороидальной неоваскуляризации после лечения «Визудином».

В России в течение ряда лет выпускается препарат для фотодинамической терапии «Фотосенс», представляющий собой 0,2 % раствор смеси натриевых солей ди-, три- и тетрасульфоталоцианина гидроксиалюминия со средней степенью сульфанирования 3. Препарат при внутривенном введении избирательно накапливается в опухоли и при воздействии света с длиной волны соответствующей пику поглощения фотосенсибилизатора (676 нм) генерирует кислород и другие активные радикалы, оказывающие токсическое действие на опухолевые клетки. «Фотосенс» применяют для лечения рака: кожи, нижней губы, желудка, полости рта, включая рак языка. Последние годы проводятся работы по созданию липосомальной формы «Фотосенса». Липосомы получали из фосфатидилхолина, холестерина и PEG-2000 PE. Количество включенной в липосомы субстанции достигает 80 %. Проведены исследования липосомальной формы препарата по изучению его фармакокинетики и токсических свойств. Полученные данные позволяют надеяться на создание оригинальной лекарственной формы препарата для фотодинамической терапии. Использование липосом, содержащих фотосенс позволяет увеличить селективность для опухоли.

Сегодня уже не вызывает сомнений перспективность применения липосомальных форм фотодинамических препаратов как для диагностики так и для лечения различных заболеваний, включая онкологические.

Препараты на основе термочувствительных липосом

В последние годы активно разрабатываются модели термочувствительных липосом, а именно, цитостатиков инкапсулированных в липосомы, которые разрушаются при нагреве до определенной температуры. Липосомы, содержащие лекарственное средство, свободно циркулируют после введения по организму больного, и высвобождение из них цитостатика начинается только в области опухоли за счет её локального нагрева. *Наиболее многообещаю-*

щим является одновременное использование термочувствительных липосом и гипертермии. Оптимальной температурой плавления липидов липосом, содержащих лекарственные препараты, является 40–43 °С. Именно нагрев опухоли под действием гипертермии до этой температуры приводит к разрушению липосомы и высвобождению цитостатика непосредственно в опухоль, что в свою очередь значительно повышает избирательность воздействия. Предложены термочувствительные липосомы пролонгированного действия с использованием оригинального липида 1,2-дипальмитолил-*sn*-глицеро-3-фосфоглицероглицерол (DPPGOG). В качестве фосфолипидных компонентов были использованы синтетические образцы: 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DPPC) и 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (DSPC). Оптимальным явилось соотношение компонентов DPPC / DSPC / DPPGOG (5 : 2 : 3). В состав липосом был введен карбоксифлюоресцеин с помощью которого было изучено распределение липосом в тканях меланомы и нормальных тканях. Диаметр липосом около 175 нм. Оптимальной температурой плавления липосом, содержащих карбоксифлюоресцеин, является 41–42 °С. Предложенный авторами состав липосом может быть использован для создания термочувствительных липосом, содержащих лекарственные препараты, в том числе и цитостатики.

Рядом авторов предложено использовать термочувствительные липосомы (40 °С), содержащие доксорубин. В экспериментах на крысах с переносимой рабдомиосаркомой не выявлено принципиальных отличий в величине противоопухолевого эффекта при сочетанном применении гипертермии с обычным доксорубином и доксорубином инкапсулированным в липосомы. В то же время, наименее выраженный общетоксический эффект термохимиотерапии наблюдался в группе животных, которым вводили липосомальную форму антрациклинового антибиотика. Термолипосомы получены из 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина, пегилированного 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламина, холестерина в соотношении 9 : 1 : 0,02 : 0,2. В качестве антиоксиданта введено 2 моль % α -токоферола. Доксорубин загружали при помощи градиента сульфата аммония. Соотношение доксорубин : липиды составляет 0,13 : 1. Применение термочувствительных липосом, нагруженных доксорубином проводили на модельных опухолях мышей: меланома

В-16 и карцинома Эрлиха при 43 °С в течение 30 минут. Авторы установили больший противоопухолевый эффект и меньшую токсичность по сравнению с используемым свободным доксорубином. Предложено использовать липосомы указанного состава для проведения термохимиотерапии солидных опухолей. Следует отметить, что идея о комбинированном применении гипертермии с химиотерапией препаратов, заключенных в липосомы с температурой фазового перехода липидов выше физиологической была высказана довольно давно. Однако до настоящего времени этот весьма перспективный метод термохимиотерапии не получил клинического применения.

Препараты магнитолипосом

Весьма перспективными являются исследования, направленные на получение магнитных наночастиц в липосомах. *Потенциальные преимущества использования липосом в системах целевой доставки* – предотвращение локального разведения лекарств и ограничение их взаимодействия с биологической средой, в которую они введены. Таким образом, *липосомы, нагруженные наночастицами* (магнитолипосомы) позволяют комбинировать диагностику и лечение, инкапсулируя контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии вместе с лекарствами. Применение липосом решает проблему растворимости и коллоидной стабильности наночастиц, которые могут коагулировать и формировать агрегаты в кровяном русле, что может приводить к эмболии. *Использование магнитолипосом имеет ряд других преимуществ*: возможность покрытия их поверхности специфическими лигандами, например, антителами или рецепторами, а также защита инкапсулированного лекарственного средства. Магнитные наночастицы, и в частности маггелит (γ -Fe₂O₃) можно применять в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии в составе липосом. Так, например, липосомы, полученные методом экструзии фосфатидилхолина, нагружались маггелитом и вводились в вену мышам. Исследование подтвердило наличие в системном кровотоке частиц маггелита, введенных за 24 часа до исследования методом магнитно-резонансной томографии.

Препараты на основе радионуклидов

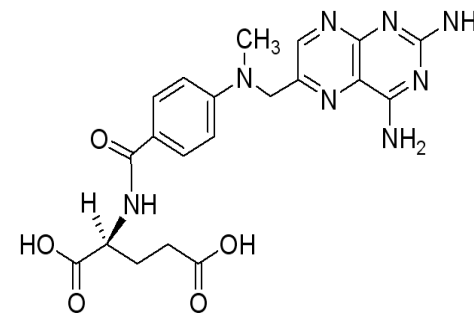
Несомненный интерес представляют данные о возможности использования липосом в качестве носителей радионуклидов, излучающих α -частицы. Норвежские ученые из университета г. Осло показали, что излучающие α -частицы радионуклиды могут быть эффективно введены в предварительно сформированные ПЭГ-липосомы. Как пассивно накапливающиеся, так и содержащие нацеленный лиганд липосомы могут рассматриваться как агенты, селективно доставляющие α -частицы в опухоли. Было показано, что пассивно нацеленные липосомы накапливаются в солидных опухолях. Липосомы с нацеленным лигандом дают повышенную эффективность накопления в опухоли и улучшение терапевтического эффекта по сравнению с ненацеленными аналогами. Альфа излучатели действуют на малом расстоянии (обычно меньше 0,1 мм) и с высоким линейным переносом энергии, что может быть использовано при молекулярно нацеленном облучении опухоли. При селективной доставке в опухолевую ткань α -частицы будут уничтожать опухолевые клетки, не повреждая окружающую нормальную ткань. Ведущий продукт в этой области «Альфарадин» (Alpharadin, ALGETA) на основе радия-223 в настоящее время находится во 2-ой фазе клинических испытаний. Новая стратегия приготовления нацеленных липосом продемонстрировала достоверное связывание с рецептором, имеющим экспрессию на опухолевых клетках. При помощи «Альфарадина» проводится лечение рака предстательной железы с образованием метастаз в костную ткань. Препарат вводят внутривенно один раз в месяц на протяжении 4–6 месяцев. Препарат избирательно действует на опухолевые ткани, не поражая здоровую ткань. Липосомальная форма препарата получена исследователями при использовании коммерческих пегелированных липосомальных форм препаратов, содержащих доксорубин гидрохлорид («Caelyx» или «Doxil»).

По мнению академика М.И. Давыдова основной проблемой лучевого и комбинированного лечения злокачественных новообразований является создание конструкций онкотропных носителей и терапевтических агентов (радионуклидов) без потери аффинности носителя.

По всей видимости, липосома может явиться одной из таких конструкций для доставки радионуклидов в опухоль.

Препараты метотрексата

Метотрексат – цитостатическое синтетическое средство группы антиметаболитов, ингибирует дигидрофолатредуктазу, участвующую в восстановлении дигидрофолиевой кислоты в тетрагидрофолиевую кислоту (переносчик углеродных фрагментов, необходимых для синтеза пуриновых нуклеотидов и их производных). Тормозит синтез, репарацию ДНК и митоз. Особо чувствительны к действию метотрексата быстро пролиферирующие клетки злокачественных опухолей, костного мозга, эмбриональные клетки, эпителиальные клетки слизистой оболочки кишечника, мочевого пузыря, полости рта. *Показаниями к применению* являются: лимфомы, лейкозы, миеломная болезнь, рак пищевода, плоскоклеточный рак головы, мочевого пузыря, легкого, печени, молочной железы, почки, мочеточников, предстательной железы, шейки матки, яичка, полового члена и другие виды опухолей. *В качестве побочных эффектов* можно отметить: острую дистрофию печени, цирроз, легочные инфильтраты, судороги, остеопороз, иммуносупрессия, тошнота, рвота и др. Несмотря на широкое использование метотрексата при многих видах опухолей, эффективность применения этого препарата ограничена частыми побочными эффектами и развитием устойчивости опухолевых клеток. На рис. 18 приведена химическая структура метотрексата.



Метотрексат

Рисунок 18 – Химическая структура метотрексата

Применение цитостатика метотрексата в качестве средства базисной терапии ревматоидного артрита ограничено из-за риска побочных действий и быстрого выведения лекарственного средства из области сустава. Была предложена лекарственная форма метотрексата включенного в фосфолипидные мицеллы (фосфоглив – 50 нм частицы), стабилизированные глицерризиновой кислотой. Методом ВЭЖХ определено включение метотрексата в наночастицы. Максимально в фосфоглив включалось не более 60 % метотрексата. На модели адьювантного артрита у крыс показан более высокий терапевтический эффект наночастиц метотрексата по сравнению со свободной формой цитостатика. За последнее время появились сообщения о создании липосомальных препаратов на основе липидных конъюгатов с цитостатическими препаратами. Биodeградируемые липидные конъюгаты лекарств (липофильные пролекарства) обладают улучшенной фармакокинетикой. Липосомальные препараты конъюгатов мелфалона и метотрексата синтезировали на основе гас 1,2-диолеилглицерина. Полученные конъюгаты инкапсулировали в липосомы из фосфатидилхолина и фосфатидилинозита в соотношении 1 : 8 : 1. В опытах *in vitro* показано, что конъюгат метотрексата в составе липосом преодолевает лекарственную устойчивость опухолевых клеток, связанных с нарушением мембранного переноса. Также были созданы липосомы метотрексата, содержащие лиганд S. В исследовании использовались культуры клеток острой лейкемии человека с разной чувствительностью к метотрексату: Т-лимфобластоидная линия CCRF-CEM и резистентная сублиния CEM / MTX. Цитотоксичность липосом, содержащих лиганд повышалась более чем в 3,5 раза на культуре клеток CCRF-CEM и в 1,6 раза в отношении резистентных клеток культуры CEM / MTX. Были синтезированы два липофильных аналога метотрексата и проведено изучение их цитотоксичности против клеток рака толстой кишки человека (HE-29 и Kato III). По мнению исследователей, полученные препараты липосом, отличающиеся высокой стабильностью, могут быть использованы для доставки лекарств в опухолевую ткань.

Сравнительное изучение фармакокинетики липосом различного состава, содержащих метотрексат, проведено на лабораторных животных. Липосомы получали при соотношении фосфолипиды : холестерин (2 : 1), причем в качестве фосфолипидов использовали яичный фосфатидилхолин (ФХ) и ди-

пальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ). Липосомы получали как с добавлением дистеароилфосфатидилэтаноламина-N-(полиэтиленгликоль)-2000 (ДСФЭ-ПЭГ), так и без него. После внутривенного введения крысам препаратов фармакокинетика и биодоступность липосомального метотрексата были значительно изменены по сравнению со свободной формой цитостатика. Концентрация метотрексата при введении липосом с ДПФХ-ДСФЭ-ПЭГ в крови, печени и селезенке была в 5,4; 8,5; 13,5 раза выше (соответственно) по сравнению с липосомами из ФХ. Кроме того, в почках концентрация метотрексата была значительно снижена у липосом с ДПФХ, чем у липосом, полученных с использованием ФХ. Причем, при исследовании липосом с ДСФЭ-ПЭГ это снижение было еще большим.

Практический опыт применения липосомальных лекарственных препаратов для лечения рака кожи все еще ограничен. В связи с этим перспективными являются работы, посвященные исследованию липосом с метотрексатом в виде геля для лечения кожных заболеваний на примере псориаза. Липосомальные препараты получали из фосфатидилхолина яичного желтка и сои, дипальмитоилфосфатидилхолина, холестерина в различных соотношениях и концентрациях. Соотношение липиды : метотрексат – 10 : 1. Концентрация метотрексата в геле 0,25 %. Лечение псориаза проводили с использованием лазера и липосомального геля. В отличие от применения геля, содержащего свободную форму метотрексата, липосомальный препарат не проявляет системной токсичности. Кроме того, за 8 месяцев после прохождения лечения у 60 % пациентов не было проявлений псориаза. При сравнении геля с различным содержанием метотрексата установлено, что 0,25 %-ый липосомальный гель метотрексата приводит к более выраженному эффекту, чем 1,0 %-ый гель свободного метотрексата.

Учитывая многочисленность побочных эффектов и частоту использования метотрексата в химиотерапии опухолей, метотрексат был одним из первых цитостатиков включенных в липосомы. В известной монографии под редакцией Г. Григориадиса, впервые опубликованной в 1980 году, одна глава полностью посвящена липосомам как переносчикам метотрексата. За прошедшие 30 лет были опубликованы сотни сообщений о создании и исследовании липосомальных форм метотрексата. Однако до сих пор не создан препарат, который нашел бы применение в клиническом использовании при химиотерапии рака.

3.2. Липосомальная форма природного фосфатидилхолина («Липин»)

«Липин» – препарат природного происхождения, представляет собой лиофилизированную форму липосом из яичного фосфатидилхолина. В отечественной литературе за последние 20 лет накоплен значительный материал по экспериментальному и клиническому изучению «Липина».

Изучение фармакокинетики липосом из фосфатидилхолина при интратрахеальном способе их введения в организм, проведенное на интактных крысах и на модели острой пневмонии с использованием радиоактивных маркеров показало, что препарат достаточно быстро и равномерно распределяется в легких. Данный вид введения обеспечивает длительное пребывание липосом в легких (до 6 часов), причем, у животных с моделью острой пневмонии липосомы задерживаются в легких в большем количестве по сравнению с контрольной группой животных. Одновременно авторами установлено, что значительная часть препарата задерживается в печени и почках, причем, у контрольных крыс содержание липосом в указанных органах достоверно выше, чем у животных с острой пневмонией. Содержание препарата в сердечной мышце не превышало 0,8 % от введенной дозы.

У животных на модели гнойной инфекции изучали возможность использования липосом из фосфатидилхолина для предупреждения нарушений деятельности сердечно-сосудистой системы. Эксперименты проводились на собаках с гнойной инфекцией. Инъекция липосом в подкожную клетчатку животным с гнойной инфекцией уменьшала и предупреждала развитие нарушений кардио- и гемодинамики по сравнению с животными контрольной группы, которые не получали лечения. Показано, что обкалывание подкожной клетчатки вокруг раны липосомами из фосфатидилхолина в дозе 25 мг/кг массы предотвращает развитие выраженных расстройств кровообращения. Результаты исследования указывают на возможность применения липосом данного состава в клинической практике для профилактики и лечения гнойной хирургической инфекции. Причем, проведение сравнения липосом из фосфатидилхолина, содержащих холестерин, и свободных от холестерина показало идентичное защитное действие. В то же время необходимо отдать

предпочтение липосомам без холестерина, так как их использование позволяет не «перегружать» организм экзогенным холестерином.

Изучение гепатопротекторного действия «Липина» проведено при комбинированном лечении на модели острой дистрофии печени, которую вызывали у крыс введением четыреххлористого углерода. «Липин» комбинировали с кордиамином, селеном и витамином Е. В гомогенатах печени определяли содержание гидроперекисей, активность каталазы, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, в сыворотке – активность ферментов. Показано, что острая дистрофия печени сопровождается ростом в гомогенатах количества первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, уменьшением активности ферментов, кроме каталазы, активность которой увеличивается. В сыворотке увеличивается концентрация маркерных ферментов цитолиза. Использование препаратов позитивно влияет на состояние печени. В органах животных, которым вводили «Липин» в комбинации с витамином Е и «Липин» в комбинации с селеном практически полностью нормализуются процессы перекисного окисления липидов. Одновременно обнаружено снижение активности сывороточных ферментов. Под влиянием препаратов полностью нормализуется секреторная функция печени. При введении «Липина» в комбинации с селеном и кордиамином интенсивность секреции желчи, содержащей желчные кислоты, фосфолипиды, холестерин полностью восстанавливалась. Таким образом, показано, что комбинированное применение кордиамина с селеном и «Липином» полностью нормализует процессы перекисного окисления липидов, состояние системы антиоксидантной защиты, внешнесекреторную функцию печени.

Изучение влияния «Липина» на макро- и микроэлементный состав сурфактанта легких у животных проведено на крысах, которым предварительно ингаляционно вводили диоксид серы. Установлено, что применение «Липина» нормализует содержание микро- и макроэлементов в сурфактанте легких у крыс. Одновременно показано, что «Липин» наиболее эффективен при раннем лечении животных (через 5 минут) и в меньшей степени – через 24 часа. При использовании «Липина» через 7 суток после острого отравления диоксидом серы отличий от нелеченных животных не обнаружено.

С помощью фосфатидилхолиновых липосом («Липина») продемонстрирована возможность коррекции нарушений центральной гемодинамики у

крыс во время геморрагического шока. По мнению авторов, полученные данные подтверждают антигипоксическое и антиоксидантное действие фосфатидилхолиновых липосом. Введение в кровотоки липосом способствует восстановлению функциональной активности поврежденных вследствие гипоксии клеточных мембран и, в первую очередь, эндотелия кровеносных сосудов.

Особый интерес представляют данные, полученные при изучении «Липина» при лечении различных заболеваний. Проведено клиническое исследование по определению *эффективности применения препарата «Липин» у новорожденных детей после продленной искусственной вентиляции легких*. Препарат вводился ингаляционно по 5 минут 2 раза в сутки с интервалом 5 часов. Доза «Липина» у новорожденных была подобрана эмпирически по максимальной клинической эффективности и отсутствию побочных явлений. Препарат использован для 17 детей, которые находились на искусственной вентиляции легких более 5 суток. Поствентиляционный период был тяжелым и сопровождался нарушениями в газовом составе крови в виде гипоксемии и стойкой гиперкапнии, выраженной одышкой, наличием воспалительных изменений. Эффективность применения препарата «Липин» определялась по динамике нормализации газового состава крови, сатурации кислорода, изменению клинических показателей в ежедневном анализе в течение проведения ингаляции «Липином» и плацебо (раствор 0,9 %-го натрия хлорида). Также проведено сравнение общего клинического течения заболевания (пневмонии) при применении данного вида лечения и без него. Уже после 2–3 ингаляций уменьшалась зависимость от постоянной дотации кислорода. На 3-й день терапии у всех детей отмечено улучшение проводимости дыхания. К 5-му дню терапии у 10 из 17 больных детей полностью исчезли хрипы, у остальных 7-ми детей влажные хрипы перестали выслушиваться через 3–5 дней после окончания курса. К концу курса ингаляций у 9 из 17-ти детей полностью купировалась одышка, у остальных – через 2–6 дней после окончания терапии. Все эти результаты достоверно отличались от таковых у детей группы сравнения, не получавших препарат. На фоне лечения авторами отмечен бронхолитический эффект, улучшение продуктивности кашля. У 8-ми детей антибактериальная терапия была уменьшена и полностью отменена через 3–5 дней после окончания курса лечения, у остальных – в течение 7–10 дней. Та-

ким образом, клинический анализ показал хорошую эффективность применения «Липина», который способствует уменьшению тяжести течения в период восстановления после искусственной вентиляции легких, разрешению пневмонии, улучшению диффузии кислорода в легких.

Эффективность «Липина» была установлена при лечении детей, больных бронхиальной астмой. Было обследовано 39 детей 4–7 лет в период обострения заболевания. «Липин» вводили методом ультразвуковых ингаляций. Суточная доза составляла 10 мг/кг массы тела. У больных определяли парциальное давление кислорода в крови и альвеолах, минутный объем дыхания и минутный объем кровообращения, а также их соотношения. Показано, что применение «Липина» приводит к нормализации большинства показателей дыхания и кровообращения, оптимизации соотношений между вентиляторными и гемодинамическими параметрами в легких. «Липин» проявлял себя как универсальный корректор вентиляционно-перфузионных соотношений в легких, а также оксигенации крови легких. Вместе с тем отмечено, что бронхиальная проводимость значительно возростала только у детей с повышенным отношением между вентиляцией и кровотоком в легких (I группа), тогда как у детей со сниженным отношением (II группа) явления бронхообструкции сохранялись. Сделан вывод, что «Липин» может быть непосредственно рекомендован детям I группы, а для детей же II группы он может применяться только в совокупности со спазмолитиками и ингибиторами протеолиза.

Клиническое изучение специфической фармакологической активности «Липина» проведено на 24 больных с хроническими заболеваниями легких, осложненными синдромом дыхательной недостаточности. Препарат вводился однократно. Было установлено, что уже через 1 час после ингаляции препарата у больных наблюдается статистически достоверное увеличение жизненной емкости легких в среднем на $(14,6 \pm 3,8) \%$ по сравнению с началом лечения. Обнаруживается значительное повышение показателей, характеризующих степень бронхообструкции. Динамика газового состава артериальной крови характеризуется тенденцией к увеличению парциального давления кислорода и насыщения им артериальной крови. Обнаруживается повышение эффективности альвеолярной вентиляции, уменьшения частоты дыхания. Таким образом, исследования специфической активности препарата «Липин» у данной группы больных при однократной ингаляции препарата

приводит к значительному повышению вентиляционной функции. Полученные данные подтверждены авторами на 53 больных гнойно-деструктивными заболеваниями легких, осложненных синдромом дыхательной недостаточности I–III уровня. Курс лечения при этом составил 5–7 ингаляций. Позитивные клинические результаты получены у 50 из 53 больных. Ни у одного больного не было зарегистрировано побочных реакций и осложнений, которые могли быть связаны с применением препарата. Положительные результаты при проведении 5–7 ингаляций наблюдались уже после первых двух введений, и оставались неизменными на протяжении всего срока лечения.

Антиоксидантная и антигипоксическая активность «Липина» была изучена на 35 больных бронхообструктивными заболеваниями, осложненными синдромом дыхательной недостаточности. Уже после первой ингаляции, по данным биохимиллюминесценции, обнаруживается существенная тенденция к снижению в плазме крови первичных продуктов свободно-радикального окисления гидроперекисей липидов, а также одного из конечных продуктов перекисного окисления – малонового диальдегида. Одновременно обнаружен рост величины активности антирадикального фермента – супероксиддисмутазы, а также повышение ферментативной активности каталазы в эритроцитах. Это свидетельствует, что уже в первые два часа после ингаляции «Липина» у больных увеличивалась активность антирадикальных и антиперекисных звеньев защиты биологических мембран. Кроме того, после первой ингаляции «Липина» обнаруживалось снижение активности сывороточных аминотрансфераз и уменьшение количества пировиноградной кислоты, что свидетельствует о нормализации процесса гликолиза. Таким образом, авторами убедительно доказана целесообразность использования у больных синдромом дыхательной недостаточности «Липина», который обладает ярко выраженной антиоксидантной и антигипоксической активностью. В основе патогенеза специфической фармакологической активности препарата лежит повышение альвеолярной вентиляции, увеличение диффузии кислорода через биологические мембраны и активация системы антиоксидантной защиты организма. Клинический эффект после ингаляции терапевтической дозы «Липина» наступает в течение 1 часа и действует на протяжении 1 суток, причем, дальнейшие ингаляции уже не приводят к существенным изменениям в состоянии больных. Кроме того, необходимо отметить, что при

использовании «Липина» в комбинации с другими препаратами, например, сальбутамолом, определенная часть этих препаратов находится во внутренней водной фазе липосом, и, благодаря их фармакокинетике, постепенно освобождается из липосомальной мембраны непосредственно в легких, что приводит к пролонгированному действию бронхолитиков в течение 12–24 часов и позволяет существенно уменьшить их суточную дозу, предупреждая таким образом их побочное действие.

Антиоксидантное действие «Липина» позволяет использовать его для лечения беременных женщин с поздним гестозом. Беременные женщины (40 человек) с поздним гестозом получали внутривенные инфузии «Липина» по 0,5 г. Курс лечения составлял от 3 до 10 дней. Показано, что включение «Липина» в терапию беременных с поздним гестозом приводит к нормализации процессов перекисного окисления липидов, возрастанию активности антиоксидантной системы. Сокращаются также сроки лечения. Частота аномалий родовой деятельности уменьшилась в 2,5 раза, несвоевременное отхождение околоплодных вод – в 1,5 раза, а кровотечения в родах и в послеродовом периоде наблюдались в 1,2 раза реже. Крайне важным является снижение количества применяемых лекарственных препаратов для лечения беременных женщин в случае использования препарата «Липин».

«Липин» применяли в комплексном лечении экспериментальных гнойных ран при использовании эстрогенов. Проведение лечения приводило к уменьшению количества нейтрофильных гранулоцитов, уменьшению деструктивных форм по сравнению с группой контроля. Также, обнаружено увеличение количества макрофагов, фибробластов и фагоцитарного индекса. Применение «Липина» приводило к сокращению времени нагноения ран на 72 часа по сравнению с контролем.

Преимущества препарата «Липин»:

- ✓ обладает антигипоксическим действием, благоприятствуя повышению скорости диффузии кислорода из легких в кровь и из крови в ткани;
- ✓ нормализует процессы тканевого дыхания;
- ✓ восстанавливает функциональную активность эндотелиальных клеток, синтез и выделения эндотелиального фактора расслабления;
- ✓ улучшает микроциркуляцию и реологические свойства крови;

- ✓ тормозит процессы перекисного окисления липидов в крови и тканях;
- ✓ поддерживает активность антиоксидантных систем организма;
- ✓ оказывает мембранопротекторное действие;
- ✓ повышает неспецифический иммунитет;
- ✓ при ингаляционном введении способствует сохранению легочного сурфактанта, что, в свою очередь, улучшает легочную и альвеолярную вентиляцию, повышает скорость транспорта кислорода через биологические мембраны;
- ✓ не нарушает функциональную деятельность органов и систем организма;
- ✓ нетоксичен.

Особый интерес представляют данные, полученные при изучении эффективности антибактериальной терапии острых деструктивных пневмоний у детей при использовании антибиотиков и препарата «Липин». В клинических исследованиях участвовали 202 ребенка (до 15 лет) с острой деструктивной пневмонией (113 детей лечили антибиотиками с использованием «Липина» – основная группа; 89 детей лечили по общепринятой схеме с использованием антибиотиков – контрольная группа). В основной группе температура тела детей нормализовалась на $2,5 \pm 0,6$ дня раньше, чем в контрольной группе. Кроме того, в основной группе детей достоверно раньше обнаруживается снижение лейкоцитоза, нормализация лейкоцитарной формулы и уровня электролитов сыворотки крови (на 5-ые сутки в отличие от 10-ти суток в контрольной группе). Течение стационарного лечения при совместном использовании «Липина» и антибиотиков снижался на $10,32 \pm 0,82$ суток.

Имеющиеся в литературе данные позволяют рекомендовать препарат «Липин» при следующих показаниях:

ПУЛЬМОНОЛОГИЯ – синдром острой и хронической дыхательной недостаточности любого генеза у взрослых и детей, в том числе у новорожденных с расстройствами регуляции дыхания, связанными с перенесенной перинатальной гипоксией и асфиксией при родах. Препарат рекомендуется применять с целью профилактики заболеваний, связанных с пребыванием в условиях повышенной запыленности (силикоз, антракоз). При ингаляцион-

ном введении «Липин» способствует сохранению легочного сурфактанта, что улучшает легочную и альвеолярную вентиляцию легких, увеличивая скорость транспорта кислорода через биологические мембраны, повышая диффузию кислорода из легких в кровь и из крови в ткани, нормализуя процессы тканевого дыхания. Несомненный интерес представляют данные полученные при применении препарата «Липин» для коррекции газообмена в легких новорожденных детей, перенесших продленную искусственную вентиляцию легких. Эффективность применения «Липина» определялась по динамике нормализации газового состава крови, сатурации кислорода, изменению клинических показателей. Изучение препарата «Липин» при острых заболеваниях нижних дыхательных путей у детей с острым обструктивным бронхитом и пневмонией приводило к нормализации фагоцитарной активности, повышению фагоцитарного индекса и количества альвеолярных макрофагов. Проведено лечение больных с хроническим бронхитом в фазе обострения, в основном, рабочих горнодобывающей промышленности. Проводили ультразвуковые ингаляции суспензией липосом препарата «Липин». В результате проведенных исследований было установлено, что использование ингаляторного введения «Липина» приводит к эффективному разрешению обструкции дыхательных путей, коррекции нарушений липидного и белкового обмена. Кроме того, применение «Липина» способствовало уменьшению сроков лечения больных с обструктивным хроническим бронхитом, в среднем, в 2–4 раза.

АКУШЕРСТВО – поздние гестозы, внутрибрюшинная гипоксия плода. Принципиальными являются данные, полученные при исследовании морфофункционального состояния тканей миометрия и плаценты у пациенток, получавших родоактивацию традиционными препаратами (окситоцин, энзапрост) и препаратом «Липин». Установлено, что «Липин», в отличие от окситоцина и энзапроста, улучшает метаболические процессы в миометрии и плаценте, уменьшая проявления тканевой гипоксии, что обусловлено, прежде всего, нормализацией функционального состояния сосудистого русла. Применение «Липина» приводит к активизации Т-клеточного звена иммунитета. Методом кардиотокографии выявлено значительное положительное влияние липосом на сократительную деятельность матки при родах. Общая продолжительность родового акта была значительно ниже в случае применения «Липина».

Кроме того, использование «Липина» позволило снизить уровень оперативных вмешательств при родах и послеродовом периоде, снизить кровопотери при родах, улучшить состояние внутриутробного плода и новорожденного. При применении «Липина» установлено снижение проявления тканевой гипоксии в миометрии, стимуляцию метаболических процессов в мышечных клетках и интерстициальной ткани, нормализацию местных иммунологических реакций, активации метаболизма миоцитов в соединительной ткани. Антиоксидантное действие «Липина» позволяет использовать его для лечения беременных женщин с поздним гестозом. Показано, что включение препарата в терапию беременных с поздним гестозом приводит к нормализации процессов перекисного окисления липидов, возрастанию активности антиоксидантной системы и сокращению сроков лечения. Частота аномалий родовой деятельности уменьшилась в 2,5 раза, несвоевременное отхождение околоплодных вод в 1,5 раза, а кровотечения при родах и в послеродовом периоде наблюдались в 1,2 раза реже. Крайне важным является снижение количества применяемых лекарственных препаратов для лечения беременных женщин в случае использования препарата «Липин».

НЕФРОЛОГИЯ – острый и хронический пиелонефрит, гломерулонефрит, диабетическая нефропатия, поликистоз, почечная недостаточность. Применение препарата статистически достоверно приводило к снижению уровня креатинина и мочевины в крови, в 3,9 раза снижало активность трансаминазы сыворотки крови, уменьшало проявления уремической гастроэнтеропатии. Изучена эффективность «Липина» в комплексной терапии у больных перитонитом. После введения липосом в 2,4 раза уменьшилось количество нагноений послеоперационных ран и в 2,7 раза снизилось количество послеоперационных пневмоний. Больные находились на лечении в больнице $15,4 \pm 2,6$ дня, что в 1,4 раза меньше по сравнению с больными не получавшими липосомальный препарат. Проведено изучение препарата «Липин» в лечении инфекционно-воспалительного заболевания почек у детей при остром и хроническом необструктивном пиелонефрите в активной стадии. Изучено влияние липосомальных форм кверцетина («Липофлаво») и фосфатидилхолина («Липин») на показатели трансмембранной проницаемости почек и легких при коморбидной ренопьюльмональной патологии. Исследования проводили на 142 пациентах с хроническим гломерулонефритом. В первую группу наблюдения включены больные, которые получали ингаляции «Липина» (утром), а «Липофлаво» (вечером) при помощи ультразвукового не-

булайзера; вторая группа больных получала только базисную терапию; третья группа больных получала как ингаляции, так и внутривенные инфузии «Липина» (утром) и «Липофлаво» (вечером). Включение в стандартный комплекс лечебных мероприятий ренопьюльмональной патологии ингаляций и инъекций липосомальных препаратов, содержащих фосфатидилхолин и кверцетин, способствует позитивному влиянию на структурно-функциональное состояние биологических мембран легких и почек. Применение «Липина» в кардиологии будет рассмотрено в главе 3.10.

Таким образом, высокая клиническая эффективность, практически полное отсутствие противопоказаний к применению, за исключением индивидуальной непереносимости, крайне низкая токсичность позволяют использовать липосомальный препарат «Липин» для лечения больных в пульмонологии, кардиологии, гастроэнтерологии, акушерстве и гинекологии. Ранее уже было показано, что применение «Липина» перспективно у онкологических больных.

По нашему мнению, роль «Липина» при клиническом применении еще недостаточно оценена. Препарат представляет собой модель биологической мембраны и, обладая уникальным фармакотерапевтическим диапазоном, может являться мембранопротектором для большинства биологических мембран организма. Подтверждением этому являются многочисленные разноплановые исследования проведенные авторами за последние 10 лет.

На рис. 19 показано строение препарата «Липин».

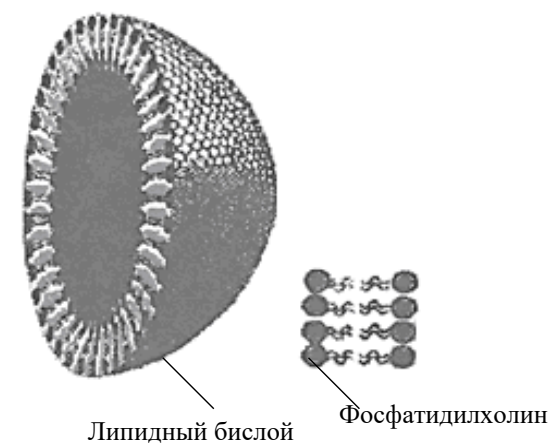


Рисунок 19 – Строение препарата «Липин»

3.3. Липосомальные формы лекарственных средств, восстанавливающих функции дыхания

Антагонисты β -2-адренорецепторов в аэрозольной форме остаются одними из основных средств лечения бронхиальной астмы. Однако частые побочные реакции этих препаратов заставляют продолжать совершенствование этих средств.

Применение *липосомальной формы беротека* (гидробромида фенотерола) открывает новые возможности воздействия на гиперактивность бронхов. Липосомы получали методом обращенных фаз из соевых фосфолипидов и холестерина при мольном соотношении 6 : 1,5. Содержание беротека составляло 1 мг/мл, величина липосом около 250 нм в диаметре. Препарат испытывали на экспериментальной модели бронхиальной астмы у кроликов, которых предварительно сенсибилизировали овальбумином. Липосомальную форму препарата вводили животным при помощи ультразвукового ингалятора непосредственно в дыхательные пути. Практически у всех кроликов после ингаляции липосомальной формой беротека отмечался более быстрый, выраженный и продолжительный бронхолитический эффект. Важно отметить, что бронхолитическое действие достигнуто при снижении дозы беротека в среднем в 2–3 раза по сравнению с использованием свободной формы беротека.

Проведена сравнительная оценка эффективности лечения больных инфекционно-зависимым вариантом бронхиальной астмы *липосомальным и водным раствором интала*. Исследуемые группы включали по 16 пациентов, в возрасте от 30 до 60 лет, с легкой и средней степенью тяжести бронхиальной астмы. Введение лекарственных форм препаратов осуществлялось при проведении фибробронхоскопии методом импульсивного орошения трахеобронхиального дерева после сеанса струйной высокочастотной искусственной вентиляции легких. В результате лечения наиболее высокий эффект достигнут у пациентов, которым вводили липосомальную форму интала. Клинические признаки обострения бронхиальной астмы купированы на 10–12 день. Отмечалась активная регрессия признаков эндобронхита вплоть до появления нормальной слизистой оболочки трахеобронхиального дерева у 95 % больных. Одновременно с этим отмечено уменьшение высеваемости бакте-

риальных культур из мокроты, бронхиальных смывов. При изучении динамики иммунологических показателей выявлено достоверное повышение числа СДЗ+ и СД8+ лимфоцитов, причем у пациентов с легким течением бронхиальной астмы уровень этих клеток стал соответствовать норме. Достигнуто повышение фагоцитоза и увеличение содержания иммуноглобулина А. Курсовая доза липосомальной формы интала была в 3–4 раза меньше, чем при использовании свободного интала. По-видимому, полученные результаты обусловлены высокими противовоспалительными свойствами интала и связаны с его внутриклеточной транспортировкой в органе-мишени и способностью восстанавливать и стабилизировать клеточные мембраны.

Проведено изучение действия *липосомальной формы гидрокортизона* на уровень эндогенного кортизона и АКТГ, а также на клеточный и гуморальный иммунитет у больных инфекционно-зависимой бронхиальной астмой. Под наблюдением находилось 39 больных с тяжелой степенью бронхиальной астмы. Все больные находились в периоде приступов и получали общепринятую терапию. Больные I группы получали преднизолон в дозе 30 мг в сутки. Больные II группы получали преднизолон в такой же дозе и дополнительно интратрахеально липосомальную форму гидрокортизона. Определяли уровень базального кортизона и АКТГ радиоиммунологическим методом. После проведения курса лечения у больных II группы наблюдалось повышение уровня базального кортизона в отличие от больных, получавших только глюкокортикостероидные препараты. Уровень АКТГ в обеих группах достоверно не изменялся по сравнению с показателями до лечения. При включении в комплексную терапию липосомального препарата происходило более значительное увеличение фракции Т-супрессоров и нормализация содержания иммуноглобулинов А и G. По мнению авторов, терапевтический эффект объясняется ингибированием липосомальным гидрокортизоном активности лизосомальных гидролаз, что приводит к снижению интенсивности воспаления трахеобронхиального дерева, что в свою очередь проявляется в снижении потребности приема пероральных глюкокортикостероидных препаратов. Установлено, что липосомы из яичного фосфатидилхолина и липосомы из фосфатидилхолина, в состав которых были введены эфиры жирных кислот, обогащенные арахидоновой кислотой, активируют образование в

альвеолярных макрофагах первичных метаболитов активированного кислорода. На рис. 20 показана химическая структура гидрокортизона.

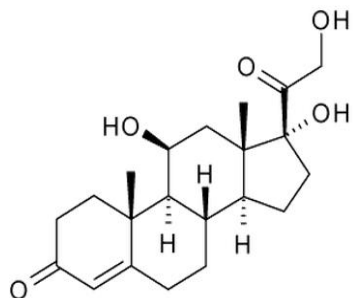


Рисунок 20 – Химическая структура гидрокортизона

В исследованиях *in vitro* на органной культуре медиастинальной плевры крыс, сенсибилизированной яичным альбумином, и *in vivo* на крысах и кроликах с экспериментальной моделью бронхиальной астмы изучали эффективность *B2-адреномиметика гидробромида фенотерола, свободного и инкапсулированного в липосомы* различного вида: из яичного фосфатидилхолина; суммарных фракций фосфолипидов легких свиньи; суммарных фракций фосфолипидов легких человека. Установлено, что свободный фенотерол уменьшал количество тучных клеток, но не обладал противовоспалительным действием. При введении липосомальной формы препарата противовоспалительное и мембраностабилизирующее действие фенотерола усиливалось и было более выраженным у липосом, полученных из суммарных фракций фосфолипидов легких человека и свиньи. Авторы предполагают, что последнее может быть связано с родством состава липосом и цитоплазматической мембраны клеток-мишеней.

Изучена возможность проведения коррекции лучевой патологии легких крыс путем однократного *интраназального введения фосфатидилхолин-холестериновых липосом*. Использовали большие однослойные липосомы, полученные методом обращения фаз из смеси соевого фосфатидилхолина и холестерина. Средняя величина липосом составила 1,7 мкм. Правое легкое

крыс однократно облучали. Через 7 и 13 недель после лучевого воздействия проведено гистологическое и электронно-микроскопическое исследование ткани легкого. Выявлено уменьшение выраженности и распространенности лучевого альвеолита, а также нарушений ультраструктуры элементов аэрогемаического барьера у пролеченных животных. Авторы выдвинули предположение, что обнаруженное уменьшение лучевого поражения структурных элементов легочной ткани под действием липосом связано как со свойствами самих липосом, так и с установленным увеличением синтеза сурфактанта. Стимуляция синтеза сурфактанта обнаруживается на 2–3 сутки после введения липосом. Авторами высказано мнение, что иммунорегуляторные свойства сурфактанта и, в частности, свойства гидрофильных сурфактантассоциированных белков, вносит вклад в уменьшение лучевого поражения легочной ткани. Возможно, захват липосом альвеолярными макрофагами и моноцитами приводит к изменению баланса цитокинов, экскретируемых этими клетками. Несмотря на то, что данное предположение авторов требует дальнейшей всесторонней проверки, можно надеяться, что использование данных липосом может быть достаточно эффективно при терапии для ослабления тяжести радиоиндуцированной патологии легких.

Имеются данные о возможности *переноса кислорода липосомами, содержащими гемоглобин*. Изучение эффективности включенного в липосомы гемоглобина в качестве заменителя для трансфузии крови при коррекции массивной геморрагии показало, что липосомы переносят кислород к периферическим тканям и поддерживают нормальный кислородный метаболизм. Авторами предложено использовать липосомальную форму гемоглобина в качестве заменителя крови при острых массивных геморрагиях. Подтверждено, что липосомы, содержащие гемоглобин, способны захватывать кислород в легких и переносить его в ткани.

На рис. 21 показано химическое строение гемоглобина, а на рис. 22 – структура гемоглобина.

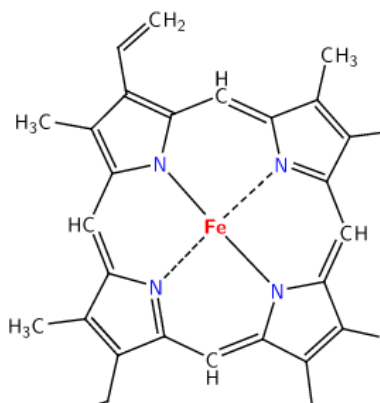


Рисунок 21 – Химическое строение гемма/белок

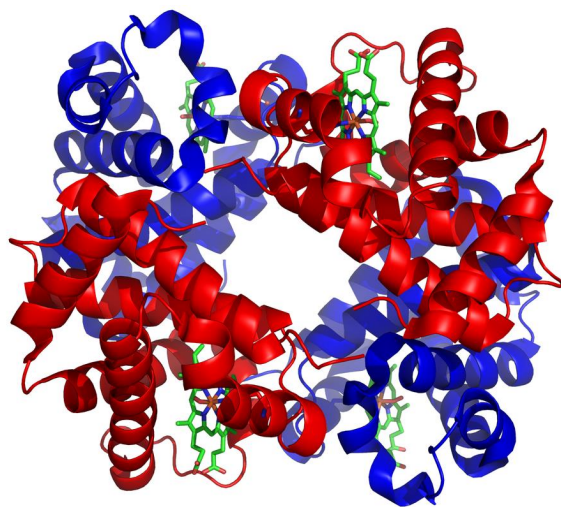


Рисунок 22 – Структура гемоглобина

Изучалось воздействие инкапсулированного в липосомы гемоглобина (неоэритроцитов) на геморрагический шок у собак. Собаки были разделены на три группы: в первой группе, состоящей из 6 собак, замена крови на неоэритроциты не вызывала шока; во второй группе, состоящей из 6 собак, неоэритроциты вводили сразу же после того, как кровопускание через вену

вызывало слабый шок; в третьей группе, состоящей из 7 собак, неоэритроциты вводили через 30 минут после кровопускания, что вызывало сильный шок. Во второй группе введение дозы неоэритроцитов, эквивалентной объему выпущенной крови, сняло симптомы шока. В то же время для снятия шока в третьей группе понадобилась доза в 1,6 раза больше объема выпущенной крови. В первой и второй группе животных не отмечалось увеличения потребности в кислороде, а в третьей группе потребность в кислороде значительно возросла. Увеличенный объем липосомального препарата эритроцитов приводил к повышению переноса кислорода и удовлетворял потребность в кислороде. Напротив, введение эритроцитов или плазмы не изменяли режима переноса кислорода, тем самым не удовлетворяли потребности животных в кислороде. С целью уменьшения захвата неоэритроцитов ретикулоэндотелиальной системой в состав липосом вводили дистеароилфосфоэтанол-аминополиэтиленгликоль 5000 дальтон в концентрации около 10 %. Обнаружено, что данный состав липосом обеспечивает трехкратное увеличение полупериода существования по сравнению с обычным фосфолипидным составом липосом, не содержащим дистеароилфосфоэтанол-аминополиэтиленгликоль. При использовании неоэритроцитов необходимо помнить, что инкапсулированный в липосомы гемоглобин удаляется из системы кровообращения преимущественно системой РЭС, и их роль в развитии сепсиса все еще остается главной проблемой.

Исследованиям по изучению гемоглобина, инкапсулированного в липосомы, посвящено значительное количество работ, в которых рассматриваются вопросы липидной композиции липосом, влияния величины частиц на биологическую активность препаратов, технологических аспектов производства и др. В настоящее время на различных этапах клинического изучения находится ряд липосомальных препаратов (см. табл. 7), способных переносить кислород и используемых в трансфузионной медицине.

Таблица 7 – Липосомальные препараты, содержащие гемоглобин

Компания производитель	Состав препарата	Стадия клинических исследований
Baxter, Illinois, США	Рекомбинантный гемоглобин	Фаза 1
Biopure, Massachusetts, США	Немопуре, поперечно-сшитый бычий полигемоглобин	Одобен для клинического применения
Northfield, Illinois, США	Polyheme, поперечно-сшитый человеческий полигемоглобин	Фаза 3
Sangart, California, США	Немоспан, ПЭГ-гемоглобин	Фаза 1/2
Hemosol, Ontario, Канада	Немолинк, О-раффиноза поперечно-сшитый гемоглобин по Awasthi V., 2007	Фаза 3

Массивная потеря крови, сопровождающаяся геморрагическим шоком, является причиной летальности при ряде заболеваний: язвенная болезнь, рак желудка, послеродовые кровотечения, разрыв аневризмы и ряд других заболеваний. Предложен способ лечения геморрагического шока с помощью *внутривенного введения препарата многослойных липосом, полученных из соевого фосфатидилхолина*. Препарат, содержащий 0,5 мг/мл фосфатидилхолина, вводят в дозе 1 мл на 1 кг массы тела. Испытания на животных (при создании модели геморрагического шока) показало, что применение липосом в позднем периоде геморрагического шока облегчает его течение и значительно увеличивает продолжительность жизни животных. Встраивание фосфатидилхолиновых липосом в клеточные мембраны органов мишеней позволяет защитить их при геморрагическом шоке. Многослойные крупные липосомы (в отличие от полученных ультразвуком) демонстрируют большую эф-

фективность за счет более высокой скорости выведения липосом из кровотока и их встраивание в клеточные мембраны.

Описана технология получения *лиофилизированного препарата липосом, состоящих из фосфатидилхолина и холестерина, содержащих будезонид* в количестве 78,99–91,79 %. При инкубации препарата с бронхоальвеолярным лаважем (метод получения клеточного материала из легких) у крыс при 37 °С в течение 24 часов содержание будезонида в составе липосом составляло 63,54 %. При ингаляционном введении крысам липосом, содержащих будезонид в количестве 100 мкг его максимальное содержание в легких достигало 36,64 мкг через 9 часов, а при введении будезонида в водном растворе – 78,56 мкг в течение 3 часов. Период полувыведения вещества из легких составила 19,47 и 5,49 мкг соответственно. По эффективности липосомальная форма превосходила свободную форму будезонида.

На рис. 23 показано химическое строение будезонида.

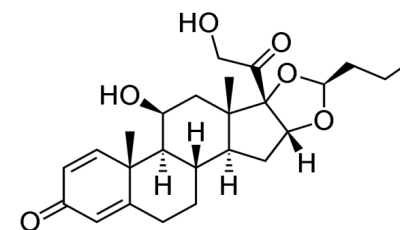


Рисунок 23 – Химическое строение будезонида

При изучении влияния липидного состава липосом на токсичность и иммунологические реакции при введении в организм установлено, что использование соевого фосфатидилхолина приводит к биологическим реакциям достаточно быстро проходившим, таким как гипертензия, тахикардия, тромбоцитопения и др. Использование в составе липосом дистеароил-фосфатидилхолина значительно снижало проявление побочных реакций. Включение в липосомы анионных фосфолипидов приводило к усилению тромбоцитопении. В качестве криопротектора при лиофилизации липосом, содержащих гемоглобин предложены Фиколл 70, аминокислоты, маннитол, глюкоза, трегалоза.

Показана возможность доставки пероксиддисмутазы к легочному эпителию посредством pH-чувствительных липосом. Липосомы были получены из 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина и 1-олеоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-сукцината. Липосомы с диаметром около 180 нм были устойчивы при 4 °С в течение 7 дней и содержали около 10 % исходно внесенного фермента. После инкубации липосом, содержащих пероксиддисмутазу, с дистальными эпителиоцитами легких плода крысы количество ассоциированного с клетками фермента возрастает в 5,1 раз. Включение фермента в липосомы увеличивает в 6,2 раза доставку фермента в клетки.

Для торможения трахеоваскулярной трансудации была поставлена задача создать на основе липосом систему для доставки противовоспалительных лекарственных средств в дыхательные пути и к воспаленным тканям. Известно, что при воспалении дыхательных путей открываются закапиллярные соустья веноулярных зазоров, что способствует скоплению жидкости и позволяет ряду молекул, например, комплемента, проникать в ткани, инициируя воспалительные процессы. β -адренергические вещества, обладающие сродством к рецепторам, предотвращают трансудацию зараженной плазмы. Однако использование данной группы соединений ограничено из-за побочных действий. Введение данных препаратов в составе липосом позволяет снизить побочные действия. Для проверки данного предположения авторы внутривенно вводили крысам *фосфатидилхолиновые липосомы, нагруженные альбутеролом*. Затем животным вводили компоненты, позволяющие открыть веноулярные зазоры и дать возможность липосомам, нагруженным альбутеролом, накапливаться в тканях дыхательных путей. Установлено, что альбутерол, инкапсулированный в липосомы, тормозит последующую трансудацию предположительно благодаря вытеканию из липосом в ткани дыхательных путей. Данное торможение действует продолжительно, что ограничивает побочные эффекты по сравнению с свободной формой альбутерола. Применение липосомальных форм данной группы препаратов может быть использовано для лечения воспалительных заболеваний.

В заключение хотелось бы отметить, что липосомальные формы: пептидов и белков, гемоглобина и его производных, бронхолитических препаратов, гормонов и ряда других препаратов позволяют восстанавливать функции дыхания.

3.4. Липосомальные препараты в офтальмологии

В предыдущих разделах нами подробно был обсужден вопрос преимуществ липосомальных форм препаратов при лечении заболеваний различной этиологии. Включение в липосомы лекарственных веществ обеспечивает их высокую эффективность при использовании для лечения офтальмологических изменений. Причем, использование липосом с лекарственными препаратами обеспечивает различные преимущества в отношении передних и задних сегментов глаза. Методы, применяемые в отношении передних сегментов, позволили значительно увеличить проникновение лекарственного препарата.

Сегодня в офтальмологической практике используется только четыре коммерческих липосомальных препарата: «Визудин» («Visudyn»), «Липоферон» («Lipoferon»), «Липофлавон» («Lipoflavon»), «Tears Again».

«Визудин» – липосомальная форма вертепорфирина. О составе и преимуществах препарата уже было рассказано выше в подразделе «Липосомальные формы препаратов в фотодинамической терапии».

«Липоферон». В патогенезе большинства заболеваний глаза (воспалительные и травматические болезни различной этиологии, болезни сетчатки, глаукома, катаракта) значительная роль принадлежит активации перекисных процессов и воспалительно-деструктивной патологии тканей наружных и внутренних структур глаза. Одним из наиболее перспективных антиоксидантов является флавоноид – кверцетин, обладающий антиоксидантными, противовоспалительными, ангиопротекторными, ранозаживляющими и другими видами фармакологической активности. Одной из причин отсутствия кверцетина в офтальмологической практике является его низкая офтальмобиодоступность, что, прежде всего, связано с его гидрофобными свойствами. Перевести кверцетин в водорастворимое состояние возможно, если включить его в мембрану липидов. На рис. 24 показано химическое строение кверцетина.



Рисунок 24 – Химическое строение кверцетина

«Липофлавон» – препарат разработан для создания водорастворимой формы флавоноида. Представляет собой липосомальную форму кверцетина. В состав препарата на один флакон входят: кверцетин – 0,75 мг, фосфатидилхолин яичного желтка – 27,5 мг, лактоза – 27,5 мг. Препарат выпускают в лиофилизированном виде с растворителем. Препарат «Липофлавон» (капли) зарегистрирован в Украине в 2006 году.

Первоначально были проведены доклинические исследования препарата. Изучение *офтальмобезвредности* изучали в трех группах экспериментов: острую офтальмотоксичность при многократных частых (каждые 15 минут в течение 6 часов) инстилляциях; хроническую офтальмотоксичность при 4-х кратных ежедневных инстилляциях в течение 28 дней; аллергизирующее действие (конъюнктивальная проба).

Специфическую *фармакологическую активность* изучали по репаративному и противовоспалительному действию препарата на моделях травматического кератита и УФ-кератоконъюнктивита у кроликов. Обнаружено, что «Липофлавон» не вызывает явлений местного раздражения и не влияет на целостность эпителия роговицы, состояние наружных структур глаза, ригидность глаза и состояние глазного дна, а также не оказывает аллергизирующего действия по данным конъюнктивальной пробы.

На модели травматического кератита у кроликов препарат оказывает репаративный эффект, ускоряя ранозаживление, что выражается в уменьшении площади раневой поверхности роговицы в 1,2–1,3 раза и сокращении сроков полной эпителизации на 2–3 суток по сравнению с не леченым контролем. Также обнаружен выраженный противовоспалительный эффект. На модели фотокератоконъюнктивита, вызванного УФ-облучением, «Липофла-

вон» обладает выраженной противовоспалительной активностью, что проявилось в ослаблении острой воспалительной реакции конъюнктивы, просветлении помутневшей роговицы, приостановлении процесса неоваскуляризации и сокращения сроков выздоровления на 2–3 суток. Полученные данные позволили перейти к изучению препарата «Липофлавон» в форме глазных капель в клинике.

«Липофлавон» в форме глазных капель применяется при поражении роговицы (проникающие и не проникающие); послеоперационных ранах роговицы (после экстракции катаракты); кератитах различного генеза; воспалительных состояниях глаз. Действие препарата основано на противовоспалительных, ранозаживляющих, ангиопротекторных эффектах кверцетина в липосомальной форме. Кверцетин обладает антиоксидантным и противовирусным действием, снижает синтез лейкотриенов и патологически повышенную сосудисто-тканевую проницаемость и способствует нормализации тканевой трофики. Липосомальная структура «Липофлавона» обеспечивает растворимость и офтальмобиодоступность при инстилляциях в форме глазных капель. «Липофлавон» хорошо переносится больными, не вызывает побочных эффектов и аллергических реакций. Препарат эффективен при лечении больных травматическими кератитами, при этом ускоряется время эпителизации, уменьшается длительность сохранения болевых ощущений по сравнению с больными контрольной группы. При применении препарата исчезновение субъективных и объективных жалоб пациентов наступает на 3–4 день после начала лечения. Применение «Липофлавона» способствовало быстрой регрессии воспалительного процесса при комплексном лечении больных после экстракции катаракты с последующей имплантацией. Выявлена эффективность «Липофлавона» в комплексном лечении дегенеративных заболеваний сетчатки, например, при не пролиферативной диабетической ретинопатии. При этом происходит длительная стабилизация патологического процесса в сетчатке, повышение зрительных функций. Как известно, глазные капли содержат консерванты: тиомерсаль, бензалкония хлорид, хлорбутанол, хлоргексидин, оказывающие в той или иной мере токсическое действие. Так, например, бензалкония хлорид в концентрации выше 0,005 % изменяет липидный слой и скорость распределения слезной пленки по поверхности глаза. *Важной отличительной способностью глазных капель «Липофлавона» является отсутствие какого-либо консерванта в составе препарата.* По нашему мнению, предлагаемый липосомальный препарат, содержащий включенный в липосо-

мы кверцетин, может быть использован для лечения и других заболеваний. Наше мнение основано на широком диапазоне действия кверцетина: антибактериальных, противовирусных, антиоксидантных, противовоспалительных и противоопухолевых свойствах данного флавоноида.

«Tears Again» – липосомальный аэрозоль, содержащий в своем составе природные фосфолипиды. Используется при слабо-умеренном синдроме сухого глаза с нарушением липидного слоя напылением на закрытые веки больного. Действует в качестве герметика для образования собственных слез больного. Обнаружено также снижение температуры век у пациентов с синдромом сухого глаза (гиперсекреторный сухой кератоконъюнктивит).

«Цитохром С» – в составе глазных капель нашел широкое применение при дистрофии и помутнении роговицы, кератитах, оказывая антигипоксическое и трофическое действие, стимулируя процессы регенерации и являясь катализатором клеточного дыхания. Механизм действия препарата связан с наличием в простетической группе железа, способностью переходить из окисленного состояния в восстановленное. В результате ускоряются эндогенные окислительно-восстановительные реакции и обменные процессы в тканях, улучшается утилизация кислорода и снижается гипоксия тканей при различных патологических состояниях. Нами предложено создание комплексного липосомального препарата, содержащего в липидном слое кверцетин и во внутренней полости липосом фермент Цитохром С. В предлагаемом препарате особая роль отведена фосфатидилхолину. Предположение основано на известной фармакологической активности фосфатидилхолина в липосомальной форме, который позволяет увеличить скорость транспорта кислорода через биологические мембраны, повышая диффузию кислорода из легких в кровь и из крови в ткани, нормализуя процессы тканевого дыхания.

Кроме указанных препаратов, уже используемых в клинической практике, проведен обширный объем экспериментальных исследований с использованием липосомальных лекарственных средств в офтальмологии: гентамицин, норфлоксацин, тобрамицин, ацикловир, амфотерицин В, дексаметазон, циклоспорин, 5-фторурацил, 5-флуорооротат, клондронат, дисульфiram, аденозинфосфат и другие лекарственные препараты, используемые в офтальмологии. Проведенные исследования убедительно доказали снижение клиренса и меньшую токсичность по сравнению со свободной формой лекарственного вещества. Одновременно показано, что липосомальные препараты обеспечивают аналогичную или более высокую эффективность в сравнении с приме-

нением свободной формы лекарства, обладающего противогрибковым или антибактериальным эффектом.

Одной из главных трудностей, связанных с глазными каплями, является то, что лекарственные средства плохо проникают в глазную ткань, и при этом время воздействия крайне ограничено. В то же время, исследования показали, что положительно заряженные липосомы увеличивают время удержания лекарственного препарата на роговице. Существует мнение, что липосомы могут служить эффективной системой доставки лекарств в офтальмологии только липофильных препаратов. Включение в липосомы липофильного противовоспалительного препарата индоксола приводило к увеличению в 2,5 раза абсорбции лекарственного средства по сравнению с обычными глазными каплями. В то же время, липосомы снижают абсорбцию таких гидрофильных препаратов как эpineфрин и дигидрострептомицин, однако увеличивают абсорбцию инулина и триамцинолона в 10 раз и 4 раза, соответственно. Исследовалась возможность применения антиметаболитов против пролиферативной витреоретинопатии. Введение липосом 5-фторурацила в дозе 500 мкг обеспечивало присутствие препарата в течение 48 часов, что в два раза превышает концентрацию 5-фторурацила введенного в дозе 1 мг свободного лекарственного средства и обнаруживаемого в организме только в течение 24 часов. Также показано, что липосомальный 5-фторурацил, вводимый в стекловидное тело глаза кроликов оставался не токсичным до использования в количестве 1,6 мг, что подтверждается данными гистологии и электроретинографии. Так же было подтверждено, что липосомальные формы цитарабина и блеомицина вводимые в стекловидное тело глаза животных менее токсичны при более высоких дозах, чем свободные формы препаратов. Липосомы, полученные из кардиолипина и содержащие мексидол и эмоксинин в модельных экспериментах на животных обладали антиоксидантной, мембранопротекторной активностью и не проявляли раздражающего действия на ткани глаза. Новые возможности использования циклоспорина в офтальмологии показали липосомальные глазные капли 0,2 %-го раствора. Препарат липосомальной формы циклоспорина получил название – «Циклолип». Показана специфическая активность на экспериментальных моделях животных. Проведенные клинические испытания подтвердили хорошую переносимость «Циклолипа» и его терапевтическую эффективность при кератопластике и лечении воспалительных глазных заболеваний. Установлено, что вводимый субконъюнктивально кроликам липосомальный циклоспорин

обеспечивает более высокий уровень лечения, чем свободная лекарственная форма. Кроме того, обнаружено пролонгированное действие липосом с циклоспорином до 4-х суток.

Эффективность липосомальных препаратов подтверждена экспериментальными данными на животных при повреждении глазной поверхности, кератитах, увеитах, кератопластике. Показана принципиальная возможность обеспечения внутриклеточной доставки генетического материала в передний сегмент глаза, а также в клетки региональных нервных узлов. Методы применения липосом в заднем сегменте включали субконъюнктивальные инъекции и инъекции в стекловидное тело. Результаты многочисленных исследований, проводимых на животных, показали, что введение в стекловидное тело липосомальных форм лекарственных средств позволяет обеспечить более продолжительную терапевтическую концентрацию в стекловидном теле и меньшую степень токсичности по сравнению со свободными лекарственными препаратами. По-видимому, липосомы высвобождают их содержимое медленно, защищая инкапсулированное лекарственное вещество от разрушения и клиренса, а также предотвращая токсическое воздействие, связанное с высокими пиковыми концентрациями, наблюдаемыми при введении свободных форм препаратов. Достаточно полный обзор данных по использованию липосом в офтальмологии был опубликован ранее.

Сегодня в мировой офтальмологической практике используется ограниченное количество липосомальных препаратов. По-видимому, уже в ближайшем будущем преимущества липосомальных препаратов найдут широкое признание во всех лечебно-диагностических и исследовательских аспектах офтальмологии.

3.5. Липосомальные формы гормональных препаратов

Лечение различных эндокринологических заболеваний требует постоянного совершенствования методов лечения и используемых препаратов. О возможности включения гормонов в липосомы указывают многие авторы. Одним из наиболее интересных является сообщение *о создании липосомальных форм тироксина и тиреотонина, являющихся гормонами щитовидной железы*. Авторы не только изучили фармакокинетику липосомальных форм, но и провели всесторонние исследования зависимости включения гормонов в липосомы от их состава и способа получения. Для получения липосом ис-

пользовали хроматографически чистый яичный фосфатидилхолин и холестерин. В качестве антиоксиданта использовали ацетат α -токоферола. Липосомы получали ультразвуковой обработкой с последующим ультрацентрифугированием. Показано, что увеличение содержания фосфатидилхолина в липосомах приводит к увеличению включения в их состав гормонов. Увеличение фосфатидилхолина в 5 раз приводило к увеличению включения тироксина и тиреотонина в 13–17 раз. Липосомальные формы препаратов вводили внутримышечно крысам, и количество гормонов в крови определяли радиоиммунным методом. Полученные результаты показали, что в сыворотке крови крыс максимальные значения количества тироксина и тиреотонина в 1,8–2 раза выше, по сравнению с содержанием гормонов в крови животных, которым вводили свободные формы препаратов. Пролонгированное действие липосомальных препаратов, по мнению авторов, может быть связано с тем, что липосомальная форма дает возможность субстанциям гормонов накапливаться в клетках организма и эффективно перераспределяться между ними. При изучении целесообразности использования липосомальных форм тироксина в лечении тиреоидной патологии необходимо учесть их влияние на активность микросомальной системы оксигеназ печени, которая принимает активное участие в метаболизме и поддержании уровня тиреоидных гормонов в крови.

Проведено полное клинико-иммунологическое обследование 78 больных *стероидзависимой бронхиальной астмой* с тяжелой формой болезни в возрасте от 18 до 63 лет. Лечение проводили *липосомальной формой ацетата гидрокортизона*, которую вводили интратрахеально. Установлено, что применение липосомальной формы гидрокортизона приводило к нормализации показателей гуморального и клеточного иммунитета, эффективному купированию воспалительного процесса в трахеобронхиальном дереве.

Исследовалось внутрикожное всасывание гидрокортизона после местной аппликации липосом, содержащих гидрокортизон. Препарат наносили на кожу площадью 1 см² безволосой мыши в дозе 0,1 мг гидрокортизона. Исследования проводили как при наличии окклюзии, так и при ее отсутствии. Концентрацию гидрокортизона определяли в роговом слое и в собственно коже. При отсутствии окклюзии количество препарата в роговом слое и в собственно коже достигало максимума в течение 1 часа, после чего достаточно

быстро уменьшалось. Причиной этого быстрого уменьшения является, по-видимому, желирование липосом в результате полной дегидратации препарата при отсутствии окклюзии, что предотвращает разделение препарата в коже. Использование окклюзии предотвращало желирование препарата, но содержание в коже гидрокортизона также резко снижалось, что в свою очередь связано с уменьшением отделения гидрофобного препарата гидрокортизона от липосом в роговом слое, гидратация которого поддерживается окклюзией. При обоих условиях концентрация гидрокортизона в слое собственно кожи была значительно ниже, чем в роговом слое, что свидетельствует о том, что разделение между этими слоями является причиной в достижении гидрокортизоном собственно кожи. Таким образом, по мнению авторов, при местной аппликации липосомальных препаратов для эффективной доставки гидрокортизона в кожу в течение длительного времени следует избегать как чрезмерной дегидратации липосом, так и чрезмерной гидратации (окклюзии) кожи. При обсуждении данного вопроса необходимо учитывать роль керамидов в коже, зависимость между низким содержанием керамида в липидах кожи и нарушения барьерной функции.

Установлено, что *гонадотропин, заключенный в липосомы*, состоящие из яичного фосфатидилхолина и дифосфатидилглицерина, выделенного из сердца крупного рогатого скота, проявляет активность в 5–10 раз большую, чем свободная форма гормона, а введение в состав липосом других липидов, например, холестерина, ганглиозидов, фосфатидилэтаноламина, резко снижает активность гонадотропина.

Имеются данные о возможности использования *липосомальной формы простагландина E-1* у больных с *органическим или психогенным нарушением эрекции*. Препарат вводили интрауретрально при помощи аппликации. Обнаружено, что аппликация липосомального простагландина не создавала достаточной жесткости и была неэффективна у больных с органическим нарушением эрекции. Однако, она создавала достаточную жесткость в 60 % случаев у больных с психогенным нарушением эрекции.

Ряд авторов указывают на возможность использования в липосомальной форме следующих гормональных препаратов: *прогестерон в составе липосом*, состоящих из яичного фосфатидилхолина и дипальмитоилфосфати-

дилхолина (1 : 1); *триамсинолон в составе липосом* из дипальмитоилфосфатидилхолина и холестерина (1,1 : 0,5).

Необходимо остановиться еще на одной группе *липосомальных препаратов, используемых при лечении ревматоидного артрита* (системное заболевание соединительной ткани с поражением суставов по типу деструктивного полиартрита). Сегодня, для лечения ревматоидного артрита используют определенные группы препаратов: нестероидные противовоспалительные препараты (например, нимесулид, метоксикам и др.); базисные препараты (например, метотрексат, циклофосфан и др.); биотехнологические препараты (например, моноклональные антитела (инфликсимаб, адалимумаб)), направленные на нейтрализацию цитокина TNF α (фактор некроза опухолей, который появляется в ответ на секрецию синовиальными мембранами глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, появление TNF α приводит к прогрессу ревматоидного артрита); кортикостероиды. Обращает на себя внимание факт создания липосомальных форм препаратов, содержащих все перечисленные группы препаратов. Мы уже обсуждали возможность включения в липосомы метотрексата, циклофосфана, метоксикама, моноклональных антител (иммунолипосомы) и ряда других лекарственных субстанций. Мы остановимся на *липосомальных формах кортикостероидных гормонов*. Для лечения ревматоидного артрита наиболее часто используют гормоны кортикостероиды, например, *гидрокортизон* и синтетический дегидрированный аналог гидрокортизона – *преднизолон*. Длительное применение кортикостероидных гормонов зависит от вводимой дозы и может приводить к серьезным побочным эффектам: усугубление явлений сердечной недостаточности, мышечной слабости, остеопорозу, гипокалиемии, панкреатиту, стероидным язвам в желудочно-кишечном тракте, синдрому Иценко – Кушинга, атрофии коры надпочечников, тошноте, рвоте, брадикардии и ряду других. В связи с этим, за последние 25–30 лет накоплен значительный материал по изучению возможности использования липосомальных форм кортикостероидных гормонов для лечения ряда заболеваний, в том числе, и ревматоидного артрита. Мы остановимся на некоторых исследованиях, которые привели к созданию липосомальных лекарственных препаратов, находящихся на разных стадиях клинического изучения.

В липосомы из дипальмитоилфосфатидилхолина и холестерина включали гидрокортизон ацетат при соотношении 1,8 : 0,225 : 2. Липосомы получали ультразвуковой обработкой с последующей стерилизующей фильтрацией через мембраны с размером пор 0,22 мкм. Препарат испытывали на 20 больных с острым ревматоидным артритом. Указанные липосомы после однократной внутрисуставной инъекции больным в дозе 0,5–1,0 мл (10–20 мг гидрокортизона) полностью в течение недели купировали все симптомы острого ревматоидного артрита, причем ремиссию наблюдали в течение 2-х лет. Доза 10–20 мг липосомального гидрокортизона в 5 раз меньше применяемой мелкокристаллической формы гормона.

На мышах с индуцированным артритом проводили изучение терапевтической эффективности липосомальной формы преднизолон фосфата и его свободной формы в дозе 10 мг/кг. Обнаружена высокая противовоспалительная активность липосомальной формы по сравнению со свободной формой гормона. При использовании липосомального препарата обнаружено сокращение разрушения хрящевой ткани. При использовании для внутривенного введения пациентам с ревматоидным артритом преднизолон, инкапсулированного в липосомы с покрытием полиэтиленгликолем обнаружена длительная циркуляция липосом и их избирательное накопление в воспаленной ткани. В то же время, использование ПЭГ-липосом приводило в 5–10 % случаев к реакциям гиперчувствительности, что потребовало от исследователей создания липосом не содержащих ПЭГ.

В 2006–2009 г.г. было проведено клиническое изучение липосомальной формы препарата «Нанокорт», разработанного фирмой «Galapagos» (Бельгия). Препарат представляет собой липосомы с размером менее 150 нм с включенным в них преднизолоном. Была показана эффективность и безопасность применения препарата «Нанокорт» у больных ревматоидным артритом. Исследования проводили на 22 пациентах с активным ревматоидным артритом путем внутривенного введения.

В 2009 году объявлено о начале II фазы клинических испытаний липосомального препарата «Нанокорт», содержащего *кортикостероиды для лечения обостренного рассеянного склероза* у 90 пациентов. Кортикостероиды (преднизолон) заключены в липосомы размером менее 150 нм. Препарат вводится внутривенно. Липосомы циркулируют в периферической крови и могут

переходить в ткани, в которых они высвобождают инкапсулированный в них гормон. Причем, преимущественно липосомы проникают в ткани в местах повреждения стенок сосудов. В очагах воспаления, например, таких как острые очаги демиелинизации при рассеянном склерозе, создаются условия для концентрирования в ткани мозга липосом с последующим непосредственным выделением гормона из липосом в место воспаления ткани. Преимуществом липосомальной формы кортикостероидов является целенаправленная доставка гормона в пораженную ткань, что в свою очередь позволяет уменьшить дозу вводимого гормона. Особый интерес представляет работа, авторы которой на модели экспериментального аллергического дерматита изучали эффективность наружного применения новой магнитоуправляемой липосомальной формы преднизолон. В липосомы полученные из суммарной фракции фосфолипидов мозга крупного рогатого скота и холестерина, включали преднизолон и мелкодисперсный магнетит. Обнаружено более выраженное противовоспалительное действие по сравнению со свободным препаратом преднизолон. Таким образом, к настоящему времени получен комплекс липосомальных препаратов, содержащих различные лекарственные субстанции, для лечения ревматоидного артрита.

На рис. 25 представлено химическое строение преднизолон.

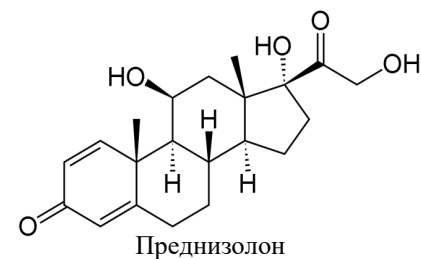


Рисунок 25 – Химическое строение преднизолон

Диабет, наряду с онкологическими и сердечно-сосудистыми заболеваниями занимает одно из ведущих мест по медико-социальной значимости и является причиной инвалидности и крайне высокой смертности. *Сахарный инсулинозависимый диабет (I тип)* требует постоянного приема *гормона ин-*

сулина, причем, довольно часто больному требуется несколько инъекций в день. Инсулин регулирует углеводный обмен, усиливает усвоение тканями глюкозы и способствует превращению её в гликоген, облегчает проникновение глюкозы в клетки тканей. Постоянное применение инсулина приводит к определенным побочным эффектам: гипогликемии, преходящие нарушения рефракции, аллергические реакции, гипогликемическая прекома и кома. Учитывая свойства липосом можно было предположить, что введение гормона в липосомальные наночастицы позволит снизить или устранить побочное действие. Работы по включению в липосомы гормона инсулина продолжаются более 30 лет. Введение инсулина путем инъекции или *per os* в виде препарата, инкапсулированного в липосомы, вызывает понижение содержания глюкозы в крови, повышение запасов гликогена в мышцах, усиление анаболических процессов, нормализацию содержания минеральных веществ.

Последнее время все большее внимание уделяется доставке лекарственных липосомальных препаратов, в основном, белков и пептидов при помощи аэрозольного введения наночастиц. Этот метод, прежде всего, удобен в связи с отсутствием инъекций и возможностью системной доставки лекарственного препарата непосредственно в легкие. Легкие представляют собой ткань с большой поглощающей поверхностью, отличающейся хорошим кровоснабжением. При *введении свободного инсулина в виде аэрозоля* на слизистую оболочку носа эффективный уровень гормона в плазме достигается быстро, однако, длительное интраназальное введение инсулина оказывает токсическое действие на слизистую оболочку. Аэрозольное применение липосомальных препаратов, содержащих инсулин продемонстрировало высокий антигликемический эффект изучаемых средств и крайне низкую токсичность.

Изучение *введения липосомального препарата инсулина при помощи спрея крысам* с моделью диабета показало значительный гипогликемический эффект с низким уровнем глюкозы в крови и более длительный период времени нахождения гормона в крови по сравнению со свободной формой инсулина. Биодоступность инсулина в липосомах составляла 38,4 %. Липосомы полученные из фосфатидилхолина, холестерина и твина 80, содержащие инсулин орально вводили кроликам с индуцированным диабетом. Использование липосомальной формы инсулина позволило продлить у животных эффект антигликемического действия гормона.

Группа ученых из университета г. Хьюстон продемонстрировали новый способ *доставки инсулина в крови с помощью ингаляции крысам липосомальных наночастиц*. Полученные липосомы содержали гормон – инсулин и конкавалин А, который чувствителен к концентрации глюкозы в крови. При повышении глюкозы в крови выше определенного уровня происходит изменение конфигурации конкавалина А. При этом липосомы разрушаются и свободный инсулин выходит в кровь. Однако, применение таких липосом у человека затруднено в связи с тем, что конкавалин А вызывает побочные эффекты, в том числе, и со стороны иммунной системы. Рядом авторов предложено использовать *небулайзер для аэрозольной доставки инсулина в липосомах*. При этом размер липосом около 1 мкм. Эксперименты на животных показали уменьшение уровня глюкозы в крови. Одновременно при использовании зонда в составе липосом было обнаружено, что липосомы были равномерно распределены на поверхности альвеол легких. Липосомы получали из гидрогенизированного фосфатидилхолина яичного желтка – холестерина-N-метоксиполиэтиленгликоль-сукциноил-2-N-дипальмитоилфосфатидил-этанолламин, PEG с м.м. 5000 в соотношении 70 : 30 : 1. Рядом авторов проведено изучение влияния липидного состава на эффективность липосомальных форм препаратов инсулина. Так, при изучении липосом, содержащих инсулин, на крысах оценивали их влияние на уровень глюкозы в плазме. Обнаружено, что при использовании в качестве основного фосфолипидного компонента эффект снижения глюкозы обнаруживался только при использовании дипальмитоилфосфатидилхолина. В то же время, при использовании димиристоил-, дистеароил- и диолеил-фосфатидилхолина в составе липосом не обнаружено снижения глюкозы в плазме. Было предложено использовать в составе положительно заряженных липосом, содержащих инсулин ингибитор протеаз – апротенин. Эффективность защиты от ферментов плазмы была подтверждена как в опытах на животных, так и опытах *in vitro*.

Использование липосомальных форм гормональных препаратов позволяет уменьшить проявление побочных эффектов, повысить терапевтическую эффективность и уменьшить используемую дозу гормона. В настоящее время

разработаны различные формы липосомальных форм гормональных препаратов: инъекционные, аэрозольные и мазевые.

На рис. 26 показана структура инсулина.

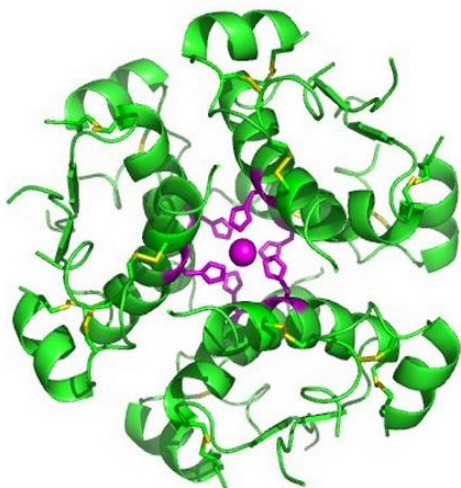


Рисунок 26 – Структура инсулина

3.6. Липосомальная форма амфотерицина В

В последние годы интерес к медицинской микологии значительно возрос. Это связано с высокой распространенностью некоторых микозов (дерматофитозы и поверхностный кандидоз), возрастанием количества иммунокомпрометированных больных, склонных к тяжелым, диссеминированным грибковым инфекциям. Эти заболевания резко повысили заболеваемость и смертность от микозов. Все это заставляет ученых постоянно искать новые противогрибковые препараты или создавать оригинальные формы уже известных препаратов. К таким новым формам относятся липосомальные препараты, в частности, «Амбизом», являющийся липосомальной формой хорошо известного амфотерицина В. На рис. 27 представлена химическая структура амфотерицина В.

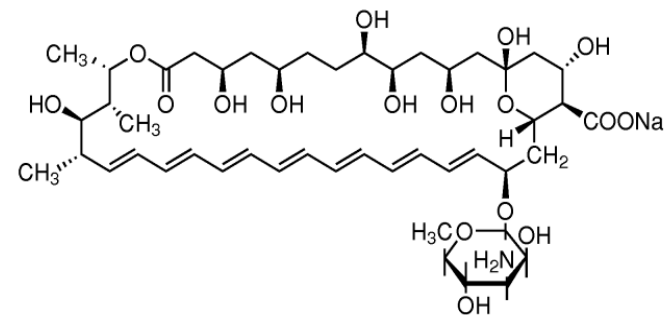


Рисунок 27 – Химическая структура амфотерицина В

«Амбизом» получен путем включения амфотерицина В в липосомы, состоящие из гидрогенизированного фосфатидилхолина соевых бобов, дистеароилфосфатидилглицерина и холестерина в молярных соотношениях 2 : 1 : 0,8. Средний размер липидных частиц составляет не более 100 нм, при этом амфотерицин растворен внутри липидного бислоя. Препарат выпускается в лиофилизированном виде. Исследование липосом «Амбизома», меченых флуоресцентным маркером, показали, что контакт липидных частиц с дрожжевыми грибами *C. albicans* и *C. glabrata* приводит к быстрому переносу амфотерицина В в мембраны грибов. Еще через 5–6 часов наблюдается включение флуоресцентной метки в цитоплазму грибковой клетки. Авторами показано слияние липосом с мембраной грибковой клетки, приводящее к разрыву липосомы и поглощению лекарства грибом.

Исследования «Амбизома» у мышей и крыс показали, что как при однократных, так и при многократных введениях концентрация амфотерицина В в плазме значительно выше, чем при использовании обычной лекарственной формы. Результаты исследования показали, что при использовании обычной лекарственной формы в крови остается менее 10 % введенной дозы, причем большая часть связывается с сывороточными белками. После введения липосомальной формы амфотерицина В концентрация препарата в печени и селезенке была выше. В то же время концентрация в почках была значительно ниже. В спинномозговой жидкости концентрация составляла менее 5 % от сывороточной. Так, при введении крысам в течение 28 дней «Амбизома» в дозе 5 мг/кг накопление препарата в тканях почек было в 5 раз ниже,

чем при использовании свободного амфотерицина. Эти данные, несомненно, подтверждают эффективность данной формы, учитывая, что нефротоксичность является наиболее важным дозозависимым осложнением терапии грибковых заболеваний свободной формой препарата. Токсичность «Амбизома» для клеток почек была в 7 раз ниже, чем токсичность свободного препарата. На снижение нефротоксичности при использовании «Амбизома» указывают и другие авторы.

Исследования острой токсичности показали, что «Амбизом» в 50 раз менее токсичен, чем обычный амфотерицин. Низкая токсичность связана, по крайней мере, частично, с формированием липофильных комплексов между дистеарилфосфатидилглицерином и амфотерицином В. Этот комплекс включается в фосфолипидный бислой в ходе формирования липосом и помогает сохранить препарат в липосомах. Высокое содержание холестерина в липосомах также способствует снижению токсичности «Амбизома», возможно потому, что холестерин повышает устойчивость липидного бислоя и благодаря аффинности амфотерицина В к холестерину в мембране. ЛД₅₀ свободного амфотерицина у мышей составляет 2,3 мг/кг, тогда как ЛД₅₀ липосомальной формы – 175 мг/кг.

Результаты изучения биораспределения препарата у крыс при многократном введении объясняют низкую почечную токсичность «Амбизома». У животных, получавших 5 мг/кг «Амбизома» и 1 мг/кг обычного амфотерицина В, почечные концентрации амфотерицина В были сопоставимы. Однако при многократном введении «Амбизома» в дозе 25 мг/кг был лишь один летальный исход. Вероятно, столь высокие дозы «Амбизома» создают меньшие почечные концентрации амфотерицина В, чем летальные дозы свободной формы. Таким образом, при введении липосомальной формы большая часть препарата не достигает почечных канальцев – основного места, повреждаемого амфотерицином В. Поскольку интактные липосомы не проходят через базальную мембрану клубочков, с почечными канальцами контактирует только освободившийся из «Амбизома» амфотерицин В. При изучении модели первичного легочного аспергиллеза кроликам с гранулоцитопенией внутривенно вводили одну из лекарственных форм антибиотика. Максимальная переносимая доза «Амбизома» составила 5 мг/кг в день, а амфотерицина В – 1,5 мг/кг в день. Выживаемость после заражения была значительно больше в

группе, получавшей «Амбизом». Частота геморрагических осложнений в группе «Амбизома» также была значительно меньше. На модели экспериментального эндокардита, вызванного *Aspergillus fumigatus* у кроликов, внутривенно вводили дезоксихолат амфотерицина и липосомальный амфотерицин в дозе 1,5 мг/кг за 4 часа и 30 минут до инокуляции *A. fumigatus*. Через 3 дня животных забивали и анализировали разрастания в аорте. У всех 19 животных, не получавших препараты, развивался эндокардит. В то же время, эндокардит развивался у 2-х из 10 животных, получавших дезоксихолат амфотерицина и у 3-х из 8 животных, получавших липосомальную форму препарата. Оба препарата были одинаково эффективны при уменьшении частоты инфекции.

В эксперименте у животных мышей BALB/c вызывали инфекцию *Leishmania major*, а затем внутривенно вводили обе формы амфотерицина, в дозах от 6,25 до 50 мг/кг. Показано, что липосомальный препарат более активен при лечении данной инфекции и менее токсичен. Свободный препарат был в 3–6 раз менее активен по сравнению с «Амбизомом» при исследовании *in vitro*. При изучении липосомальной формы амфотерицина и дезоксихолата амфотерицина на модельной инфекции лейшманиоза, вызванного *Leishmania infantum*, обнаружены идентичные результаты по антигрибковой активности. В то же время липосомальная форма проявляла значительно меньшую токсичность.

Эффективность «Амбизома» по сравнению со свободной формой амфотерицина В показана при введении мышам, инфицированным *Candida*. При этом животные жили более 42 дней. При лечении «Амбизомом» мышей с бластомикозом легких (*B. dermatitidis*) в дозе 7,5 мг/кг показана эффективность в 70–100 % случаев, в то время как свободный препарат совсем не давал эффекта.

Изучение токсичности «Амбизома» проводили на крысах, которым препарат вводили внутривенно. Средние концентрации амфотерицина в плазме составляли 500 мкг/мл у самцов и 380 мкг/мл у самок после 30-ти дней введения препарата в дозе 20 мг/кг. Авторы предполагают, что «Амбизом» поглощается тканями по типу насыщения. Введение «Амбизома» в дозах до 20 мг/кг в день приводило к 100-кратному повышению концентрации

амфотерицина В в плазме при достоверно более низкой токсичности по сравнению с лечением свободной формой амфотерицина В.

Высокая эффективность «Амбизома» в экспериментальных исследованиях позволила рекомендовать данный препарат для лечения больных в клинике. Существование больных с почечной недостаточностью или неприемлемой токсичностью исключало применение обычной терапии с амфотерицином. Все это ускорило внедрение «Амбизома» в клинику.

Аспергиллез – самая частая причина инвазивной инфекции у больных нейтропенией и, несмотря на лечение амфотерицином В, смертность превышает 90 %. Больные, получающие лечение по поводу гемобластозов, особенно восприимчивы к грибковой инфекции из-за длительных периодов иммуносупрессии и нейтропении.

Лечение больных с аспергиллезом продемонстрировало высокий процент излеченности при использовании «Амбизома»: в 9 из 22 случаев доказанного аспергиллеза (41 %) инфекция была устранена; в 13 случаях из 21 (62 %) было получено полное или частичное разрешение рентгенологических и клинических признаков болезни. «Амбизом» назначали 36 больным с доказанным или подозреваемым аспергиллезом. У 19 больных (53 %) было получено полное или частичное разрешение признаков инфекции, причем в 8 случаях (42 %) на фоне лечения обычным амфотерицином В наблюдалось прогрессирование болезни. Так же на больных была подтверждена меньшая токсичность липосомальной формы препарата.

Значительное количество работ посвящено использованию «Амбизома» при различных формах кандидоза. Имеется сообщение о применении «Амбизома» в 137 случаях грибковой инфекции. В 108 случаях инфекция сопровождалась клиническими проявлениями. В 83 % случаев инфекция была устранена. Из 11 случаев поверхностного кандидоза 8 – излечены, а в 3 случаях получено клиническое улучшение. Эффективность «Амбизома» установлена на больном с кандидозным эндокардитом. Больной был излечен при получении 2,5 г «Амбизома» на курс лечения при ежедневном приеме 2,6 мг/кг. Имеются сообщения об эффективности «Амбизома» при лечении микозов глаз.

Высокая эффективность «Амбизома» показана при введении недоношенным новорожденным с тяжелой грибковой инфекцией. Наиболее часто у

детей выделяли *Candida albicans* (более 70 % случаев). Длительность лечения внутривенным введением препарата составила от 7 до 49 дней, кумулятивная доза – от 7 до 138,8 мг/кг. Введение «Амбизома» было эффективно у 72,7 %. Выжили после лечения липосомальным препаратом 63,6 % детей. Побочных эффектов при использовании препарата не наблюдалось. На возможность применения «Амбизома» у грудных и новорожденных детей с низкой массой тела указывают и другие авторы. В данных работах отмечаются преимущества применения «Амбизома» у детей: возможность введения высоких доз без повышения токсичности; возможность вводить препарат быстрее и в меньших объемах.

В заключение хотелось бы отметить, что «Амбизом» является высокоэффективным липосомальным лекарственным препаратом при резистентности к обычной форме амфотерицина В, при развитии нефротоксичности после приема свободной формы препарата, в тех случаях, когда обычный амфотерицин противопоказан из-за снижения почечной функции. Использование свободной формы амфотерицина В связано с острой и хронической токсичностью, лихорадкой, ознобом, рвотой, высокой кардиотоксичностью. Длительная терапия приводила к гипокалиемии, нарушению функций почек, гематологической патологии. Другой серьезной проблемой, связанной со свободной формой этого препарата, была негативная реакция на химиотерапию у пациентов с ослабленным иммунитетом, больных СПИДом, нейтропенией, опухолевыми заболеваниями. Препарат «Амбизом» рекомендован для больных, которым проводились трансплантации костного мозга, печени, комплекса сердце – легкие. Активность препарата установлена при лечении аспергиллезов, лейшманиозов, кандидозов. Особо, хотелось бы отметить перспективность использования препарата у детей.

Таким образом, разработка и выпуск компанией «Nexstar» препарата «Амбизом» кардинально изменили подход и результативность лечения микозов. Появление «Амбизома» дало толчок к выпуску других препаратов, содержащих амфотерицин В в липосомах: «Amphocil» (компания «Liposome Technology») и «Abelcet» (компания «Liposome»).

3.7. Липосомальные формы противомикробных препаратов

В последние годы внимание многих исследователей привлекают липосомальные препараты антибиотиков. Задачей получения новых лекарственных форм антибиотиков является разработка препаратов устойчивых к гидролазам, например, к β -лактамазам. Для предотвращения возникновения резистентных форм бактерий и повышения эффективности препаратов получены липосомальные формы антибиотиков (защита антибиотика происходит в результате включения антибиотика в положительно или отрицательно заряженные липосомы). Комплекс антибиотик – липосома повышает химическую стабильность антибиотика; повышает проникновение антибиотика через мембрану бактериальной клетки; изменяет фармакокинетику лекарственного препарата, что позволяет снизить токсичность антибиотика и повысить специфическое действие препарата. За последние 10–15 лет исследователями опубликован обширный материал, посвященный созданию и использованию липосомальных форм антибиотиков.

Терапевтическая эффективность противотуберкулезных препаратов при экспериментальном туберкулезе также повышается при включении в липосомы соответствующих лекарственных средств, что может быть обусловлено увеличением их концентрации в месте действия и внутри клеток моноцитарно-фагоцитирующей системы, снижением инактивации лекарственных веществ в сосудистом русле, замедленном их выведении из организма. Химиотерапевтическую эффективность препаратов *стрептомицина* оценивали по влиянию на выживаемость мышей, инфицированных культурой вирулентного штамма микобактерий туберкулеза HRV. Продолжительность жизни мышей при введении липосомального препарата была на 20 % больше, чем при введении раствора свободного стрептомицина. Также установлено активное действие препарата при подсчете колоний микобактерий в гомогенатах легких и селезенки, количество которых достоверно снижалось по сравнению с контролем. Аналогичные данные были получены при исследовании липосом, содержащих ³*H-дигидрострептомицин*. Крысам, зараженным микобактериями туберкулеза, вводили липосомы, содержащие *рифампицин*. Использовали липосомы, полученные на основе яичного фосфатидилхолина, методом детергентного диализа. Концентрация антибиотика в липосоме составляла 700–900 мкг/мл. При введении свободного рифампицина в растворе

и в составе липосом концентрация антибиотика в крови через 15 минут равнялась соответственно 1,6 и 5,2 мкг/мл. Через 8 часов в первом случае содержание антибиотика снизилось до меньшего значения, чем минимальный детектируемый уровень, а при использовании липосомальной формы антибиотика содержание препарата в крови было около 0,5 мкг/мл.

На модели хронической летальной инфекции мышей *Mycobacterium avium* изучали возможность увеличения интервала между инъекциями при введении свободной и липосомальной форм *амикацина*. Введение таких липосомальных препаратов приводило к высокой и стойкой концентрации препарата в инфицированных тканях, превышающую минимальную тормозящую концентрацию для *M. avium*, в течение не менее 28 дней. В результате еженедельного, а в ряде случаев ежемесячного применения липосомального амикацина значительно снижалось размножение бактерий в инфицированных тканях и увеличивались сроки выживания зараженных мышей.

Проведено изучение влияния липосомального комбинированного препарата, содержащего *тетрациклин* и *стрептомицин* на активность некоторых ферментов печени у экспериментальных животных. Фосфатидилхолиновые липосомы, содержащие антибиотики (стрептомицин – 5 мг/мл, тетрациклин – 5 мг/мл) вводили внутрибрюшинно мышам по 0,3 мл. В ходе исследования при сравнительном изучении влияния комбинированного препарата в липосомальной форме и свободной форме стрептомицина и тетрациклина на активность ферментов белых мышей выявлено, что включение антибиотиков в липосомы позволяет уменьшить их ингибирующее действие на протеазу, щелочную фосфатазу, фосфорилазу, а также снизить активирующее действие препарата на АТФ-азу в два раза. Причем, это действие проявлялось преимущественно в первые 2–4 часа после введения животным. В более поздние сроки (через 24 часа) активность изученных ферментов нормализовалась до контрольных величин, за исключением фосфорилазы, активность которой в течение указанного времени полностью ингибировалась.

В липосомы, полученные из яичного фосфатидилхолина и фосфатидилсерина (мольное соотношение 7 : 3), включали *рифабутин* и проводили исследования антибактериального действия препарата. В качестве модели использовали мышей, инфицированных вирулентным штаммом *Mycobacterium avium* (штамм Р 1581). Проводили исследования по 2 схемам: лечебной и профилактической. Лечебная схема начиналась через 2 недели

после инфицирования, а профилактическая за 1 день до заражения животных микобактериями. При изучении обеих схем введения использование липосомальной формы рифабутина приводило к достоверному усилению действия препарата против микобактерий по сравнению с действием свободного рифабутина.

Доказана высокая эффективность действия липосомальной формы **рифампицина**, введенного ингаляторно при лечении мышей зараженных *M. Tuberculosis*. Введение антибиотика в липосомы позволило снизить дозу рифампицина, что в свою очередь, как и в случае других липосомальных препаратов, позволило уменьшить токсичность препарата.

Проведено изучение влияния высокоэффективного противотуберкулезного препарата **перхлозона** в липосомальной форме на морфофункциональное состояние печени и почек у белых крыс. Липосомы получали из фосфолипидов яичного желтка и рыбьего жира в соотношении 2 : 3. Липосомы получали ультразвуковой обработкой. Животным вводили препарат один раз в сутки в дозе 20 мг/кг. Первой группе животных вводили свободную форму перхлозона; второй группе – липосомальную форму перхлозона; третьей группе вводили свободные липосомы. При введении свободного перхлозона в печени обнаружены выраженные гемодинамические нарушения, отек и инфильтрация лейкоцитами, обнаруживались участки из гепатоцитов с выраженной зернистой и жировой дистрофией. При введении липосомальной формы перхлозона изменения в печени менее выражены, а проявления дистрофии у большинства животных отсутствовали. При изучении влияния препаратов на почки обнаружено, что при использовании свободного препарата содержание креатинина и белка увеличивалось на 68 % и 51 %, соответственно, в то время как при изучении липосомальной формы перхлозона содержание креатинина и белка увеличивалось только на 31 % и 33 %, соответственно. При введении свободных липосом не выявлено нефро- и гепатотоксических проявлений. Авторы обращают внимание на присутствие в липосомах рыбьего жира с рядом жирных кислот, содержащих 5 и 6 двойных связей, отсутствующих в животных и растительных липидах.

В крупные липосомы, состоящие из яичного фосфатидилхолина и холестерина, включали **гентамицина** сульфат в молярном соотношении 7 : 2 : 7. Для изучения распределения антибиотика в организме препарат липосом вводили кроликам внутримышечно. Доза антибиотика составляла

3 мг/кг. Концентрация гентамицина в плазме после внутримышечного введения липосомальной формы препарата была чрезвычайно мала по сравнению с введением свободной формы антибиотика. Так, концентрация гентамицина, введенного в липосомах, была в 8 раз меньше по сравнению со свободной формой. По-видимому, липосомальная форма антибиотика, введенная внутримышечно, создает депо и обеспечивает длительное выведение лекарства из места инъекции, тем самым обеспечивая продолжительное сохранение необходимых концентраций гентамицина в плазме.

Установлена эффективность действия антимикробных тритерпеновых гликозидов: **азиатикозида** и **корхорузина** с углеводными фрагментами на микобактерий *in vivo* и *in vitro*. Гликозиды включали в фосфатидилхолиновые липосомы. Показано, что противомикробное действие липосомального препарата гликозидов значительно выше, чем у свободных гликозидов. Предполагается возможность использования липосом для доставки гликозидов к мишеням.

Комбинация **повидон-йода** (поливинил-пирролидон-йода – ПИ) и липосом обладает высокоэффективным противомикробным действием антисептического вещества с отличной переносимостью и отсутствием иммуногенности липосом. Кроме того, липосомы создают влажную молекулярную пленку в окружающей рану среде. Липосомы действуют как резервуары, пролонгируя освобождение активного компонента препарата. ПИ применялся в офтальмологии не только как до- и послеоперационный антисептик, но и для лечения бактериального и вирусного конъюнктивита. Разработаны липосомальные препараты – глазные капли с 2,5, 3,0 и 5,0 %-ым содержанием ПИ. Высокую эффективность этих капель продемонстрировали испытания на добровольцах. Показана хорошая переносимость препаратов. Исследования на кроликах с моделью глубокой стафилококковой инфекции глаза продемонстрировали положительные результаты по сравнению с плацебо и антибиотиком широкого спектра действия.

Показано, что при использовании липосомального гидрогеля липосомы накапливаются на дне раны для прямого действия против инфекции и способствуют заживлению ран, полученных при ожогах. Исследования на животных эффективности и переносимости различных составов гидрогеля с липосомами, содержащими ПИ при глубоких кожных ожоговых ранах показали

высокую эффективность заживления, уменьшение воспаления и отсутствие гиперкератоза.

Хорошо зарекомендовал себя антибактериальный препарат **хлорофиллит**, который получают из листьев эвкалипта шарикового путем экстракции гидрофобной антимикробной субстанции органическими растворителями. Препарат выпускают в нескольких формах: этанольный экстракт раствора липидного масла и раствор масла. Препарат применяют наружно или инъекционно в виде разведенного (на 0,9 % раствора натрия хлорида) этанольного раствора. Ограничением использования инъекционного хлорофиллита является гидрофобность компонентов препарата. По нашему мнению было целесообразно создать водорастворимую инъекционную форму для внутривенного введения. На основании проведенных исследований был предложен оригинальный липосомальный препарат в виде лиофилизированных липосом, содержащих в липидном бислое гидрофобные компоненты хлорофиллита, обладающие антибактериальным действием. Учитывая, что хлорофиллит используется при терапии пародонтита (в виде полосканий) при носительстве стафилококка в ротовой полости, было проведено изучение препарата на животных с двумя моделями пародонтита, вызванного введением эндотоксина или с использованием гомогенизированной пищи. Применение липосомальной формы препарата продемонстрировало высокую парадонтопротекторную активность, которая обусловлена антиоксидантным, антигипоксическим, антибактериальным и мембраностабилизирующим действием препарата.

Методом экструзии были приготовлены различные липосомальные препараты из природных липидов (димиристоилфосфатидилхолин : холестерин : дипальмитоилфосфатидилсерин – 4 : 3 : 4), нагруженные **офлоксацином**. Проводили определение антимикробного действия липосомальных форм по сравнению с действием свободного препарата. В качестве модельных штаммов использовались культуры *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. При использовании инкапсулированного в липосомы офлоксацина количество колоний было, по крайней мере, вдвое меньше, чем при применении свободного препарата. Липосомальный препарат вызывал более высокую концентрацию офлоксацина в клетках бактерий по сравнению со свободной формой.

Предложена липосомальная форма антибиотика **амикацина-сульфата** («АгиКасе») в виде раствора для ингаляций при лечении муковисцидоза с хронической инфекцией, вызванной *Pseudomonas Aeruginosa*. В настоящее время в России проводятся клинические испытания препарата «АгиКасе» производства Чунцинской Дасинской фармацевтической компании (Китай).

Получены липосомы, содержащие **натриевую соль бензилпенициллина** и **бензатин бензилпенициллин** с степенью включения антибиотиков во внутреннюю фазу липосомы 72 % и 86 %, соответственно. Липосомальными формами антибиотиков и их свободными формами проводили лечение кролей с экспериментальным первичным и вторичным сифилисом. Изучение показало полную негитивацию реакции микропреципитации при применении липосомальных форм и 60–70 %-ую негитивацию при лечении свободными формами антибиотиков. Важным является факт того, что липосомальные антибиотики вызывали незначительную степень патоморфологических изменений в печени, селезенке, почках в отличие от свободных форм препаратов. При этом наиболее эффективен препарат с натриевой солью бензилпенициллина.

При изучении на мышах установлена способность липосомальных форм препаратов глубоко проникать в кожу и её придатки. Результаты гистологического исследования кожи показало, что фосфатидилхолиновые липосомы с инкапсулированным в них красителем (трипановым синим) проникают в эпидермис, дерму, а также в волосяные фолликулы и в просвет сальной железы. Скопление красителя обнаружено вблизи сосудов и в стенке капилляров. Эти данные позволяют использовать липосомы для наружного применения. Авторы исследований получили липосомы с **цефазолином** методом обращения фаз. Проведены исследования на 74 пациентах с угревой болезнью отягощенной *S. aureus*. Показана клиническая эффективность применения цефазолина, включенного в липосомы. Кроме того, исследователи установили, что цефазолин в липосомальной форме более стабилен при хранении при 3–5 °С по сравнению со свободной формой антибиотика при тех же условиях хранения. Противомикробная активность липосомального препарата в течение 50 дней хранения снизилась только на 1,5 %, в отличие от раствора свободного антибиотика, активность которого снизилась на 37 %. Липосомы предохраняют цефазолин от процессов химической деградации, например, окисления.

Получены результаты изучения липосомальных антибиотиков при лечении экспериментального стафилококкового остеомиелита. **Ципрофлоксацин** и **винкомицин** инкапсулировали в катионные, анионные и нейтральные липосомы, полученные обработкой ультразвуком в течение различного времени. Липосомы получали из яичного фосфатидилхолина (ЯФХ), стеариламина и холестерина (Х) в соотношении 7 : 2 : 1 – катионные; ЯФХ, L-α-фосфатидил-DL-глицерин и Х в соотношении 7 : 2 : 1 – анионные; ЯФХ и Х в соотношении 7 : 1 – нейтральные. Размер липосом не превышал 100 нм. Полученные липосомальные препараты антибиотиков вводили кролям внутривенно в течение 7 или 14 дней. При изучении антибактериальной активности в опытах *in vitro* максимальной активностью обладали препараты, обработанные ультразвуком в течение 40 сек. При использовании липосомальных форм антибиотиков уменьшено проявление побочных эффектов (нефротоксичность, диарея и др.) по сравнению со свободной формой этих антибиотиков. Стерилизация костной ткани была более эффективной при использовании липосомальных форм антибиотиков, причем, более результативным было использование комбинации липосомальных препаратов ципрофлоксацина и винкомицина. Свободные формы антибиотиков проявляли существенно меньшую антибактериальную активность.

Рядом исследователей проведено изучение зависимости антибактериальной активности липосом, содержащих антибиотик **цефалексин** по отношению к культуре *Staphylococcus aureus*. Липосомы получали из L-α-дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), диацетилфосфат (ДФ), стеариламин (СА) в следующих соотношениях: ДПФХ – антибиотик (нейтральные); ДПФХ – антибиотик – СА (7 : 2 : 1) (положительные); ДПФХ – антибиотик – ДФ (7 : 2 : 1) (отрицательные). Установлено, что отрицательно заряженные липосомы обладают более высокой антибактериальной активностью по сравнению с нейтральными и положительно заряженными липосомами. Одновременно авторы установили зависимость между зарядом (составом) липосом и значениями температуры фазового перехода.

Липосомы, полученные из 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин и холестерина в соотношении 2 : 1, содержащие **аминогликозидные антибиотики**: гентамицин, тобрамицин и амикацин изучали на модели *Burkholderia cenocepacia*. Антибактериальная активность липосомальных форм была выше по сравнению со свободными формами антибиотиков, причем, тобрами-

цин проявлял антибактериальную активность в 4 раза выше по сравнению со свободной формой антибиотика. Необходимо отметить, что «Axentis Pharma» (Швейцария) создала липосомальную форму антибиотика тобрамицина «Fluidosomes» для лечения хронических респираторных заболеваний легких. Препарат предложен в виде аэрозольной формы. Установлен терапевтический антибактериальный эффект по отношению *Burkholderia cenocepacia* у пациентов с муковисцидозом.

При лечении инфекционных заболеваний липосомы применяют в качестве носителей антимикробных агентов – антибиотиков различной структуры.

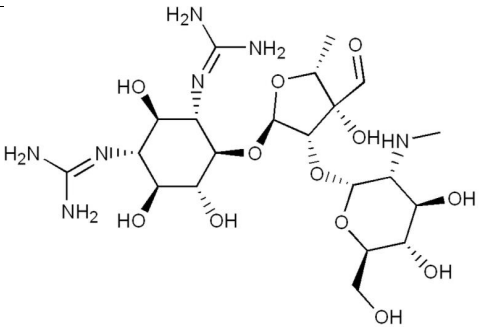
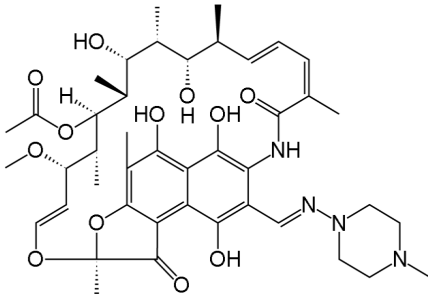
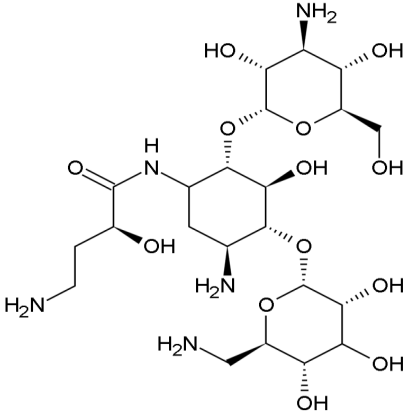
Преимуществом липосомальной формы антибиотиков для лечения бактериальной контаминации является:

- ✓ антибиотики, инкапсулированные в липосомы не подвергаются действию экзогенных гидролаз, что является одним из путей борьбы с резистентностью к антибиотикам;
- ✓ при попадании в организм липосомальные лекарственные формы антибиотиков обладают выраженным пролонгированным действием по сравнению со свободными формами антибиотиков;
- ✓ липосомы, содержащие антибиотики сливаются с наружной мембраной клеточной стенки бактерий, проникая во внутрь бактериальной клетки, что приводит к её гибели.
- ✓ липосомы, содержащие антибиотики приводят к снижению проявления побочных эффектов по сравнению со свободными формами антибиотиков;
- ✓ антибиотики, инкапсулированные в липосомы проявляют большую антимикробную активность по сравнению со свободными формами антибиотиков.

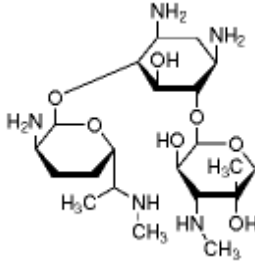
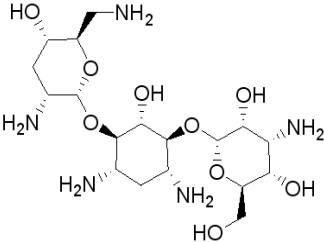
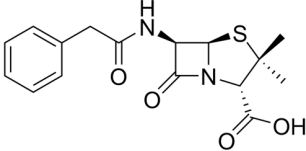
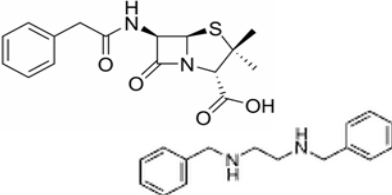
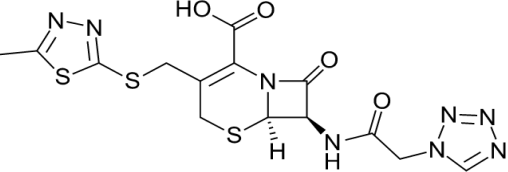
В последние годы созданы липосомальные коммерческие препараты содержащие антибиотики: доксорубин, даунорубин, амфотерицин В, тобрамицин, амикацин и ряд других.

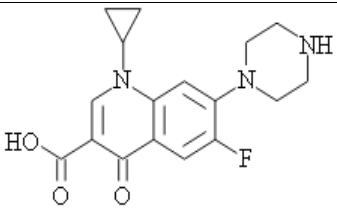
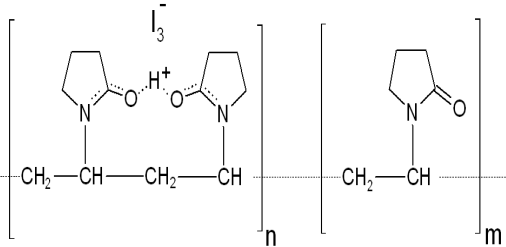
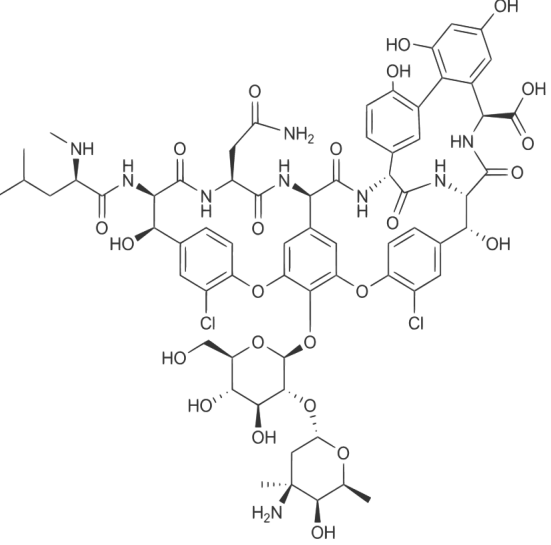
В табл. 8 показана химическая структура противомикробных соединений.

Таблица 8 – Химическая структура противомикробных соединений

Антибиотик	Химическая структура
1	2
Стрептомицин	
Рифампицин	
Амикацин	

Продолжение таблицы 8

1	2
Гентамицин	
Тобрамицин	
Бензилпенициллин	
Бензатина-бензилпенициллин	
Цефазолин	

1	2
Ципрофлоксацин	
Повидон-йод	
Вакомицин	

3.8. Липосомальные формы нейротропных препаратов

Проведено изучение возможности липосом пролонгировать действие нейротропных препаратов при их местном введении. Липосомы готовили из яичного высокоочищенного фосфатидилхолина путем ультразвуковой обработки. В липосомы включали аминазин, дикаин, новокаин, тримекаин, галоперидол, дроперидол, пипольфен, лидокаин. Испытания липосомальных форм указанных препаратов проводили на белых мышцах массой 25–30 г и кроликах. Методом 1H-ЯМР авторами показано, что линии протонов ароматических колец аминазина, пипольфена, галоперидола и дроперидола в присутствии липосом из яичного фосфатидилхолина введении его в липосомальной форме судорог не наблюдалось, что может свидетельствовать о низкой токсичности препаратов в липосомах.

Проведены эксперименты на кроликах, которым вводили интрацестерально по 0,3 мл свободной формы хлорида бупивакаина (5 мг/мл), и бупивакаина в липосомах (5 мг/мл), свободные липосомы и фосфатный буфер на 0,9 %-ном изотоническом растворе натрия хлорида. При угнетении дыхания проводили механическую вентиляцию легких или внутривенное введение допамина. Через 7 суток после введения у кроликов извлекали целиком спинной мозг и проводили гистологическое изучение поперечных срезов. Растворы, не содержащие бупивакаина, вызывали признаки раздражения, требовавшие введения седативных средств у большинства кроликов. В группах, получавших свободный и липосомальный бупивакаин, обнаружена более продолжительная блокада (126 мин против 70 мин), несмотря на одинаковую продолжительность угнетения дыхания. Коррекция гипотензии после простого бупивакаина требовала более продолжительной инфузии и больших доз допамина, чем при введении липосомальной формы. Было показано, что липосомальная форма бупивакаина вызывает менее тяжелую симпатическую блокаду и более продолжительный двигательный блок, в то время как гистологические изменения были практически одинаковы. Применение этих липосом позволяет пролонгировать местное анестезирующее действие бупивакаина.

Доза, необходимая для коррекции обмена допамина при экспериментальном паркинсоническом синдроме у мышей, может быть снижена в 10 раз

при инкапсуляции в малые однослойные липосомы, имеющие размеры 60 нм и состоящие из яичного фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 7 : 3.

При использовании липосом как самостоятельных препаратов или в качестве переносчика лекарственных средств, необходимо учитывать влияние липосом на клетки человеческого организма. По-нашему мнению, определяющим в данном случае может являться как химический состав липосом, так и их размер. Необходимо также учитывать концентрацию липосом в крови. Примером могут явиться исследования по изучению влияния *in vitro* на фибробласты человека липосом, полученных из соевого фосфатидилхолина. Фибробласты человека инкубировали в течение 72 часов с липосомами размером от 78,3 до 86,4 нм. Липосомы использовали как в свободном состоянии, так и нагруженные витамином Е в молярном соотношении 10 : 0,5. Инкубацию липосом размером 50 нм и 200 нм проводили в низкой и высокой концентрациях. Изучение морфологических свойств фибробластов и их активности показало отсутствие влияния низких концентраций липосом на клеточную жизнеспособность. В то же время, изучение липосом из фосфатидилхолина размером 200 нм приводит к заметной потере активности клеток, которая приобретала обратимый характер при добавлении витамина Е. В связи с этим, предложено использовать липосомы, содержащие витамин Е, для доставки высоких доз лекарственных препаратов, так как такой комплекс предотвращает морфологические изменения фибробластов, связанные с изменением их мембран. Введение в липосомы витамина А снижало вязкость крови и уменьшало лизис эритроцитов, по сравнению с введением свободного ретинола.

Начиная с 90-х годов XX столетия, были начаты работы по изучению липосомальных форм фосфолипидов нервных тканей гипоталамуса и коры головного мозга новорожденных животных. На основании полученных данных были предложены два липосомальных инъекционных лекарственных препарата: «Липосом Форте» и «Трикортин-1000». Производитель препаратов «Fidia Farmaceutical SPA», Италия. Введение фосфолипидов приводит к активации обмена веществ способствующих нормальной деятельности нейрона, активации мембранных ферментов, увеличивает активность нейротрансмиттеров, метаболизма глюкозы. Изучение безопасности препара-

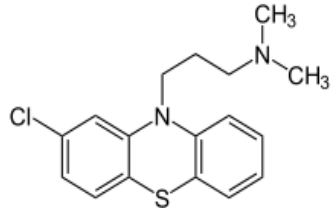
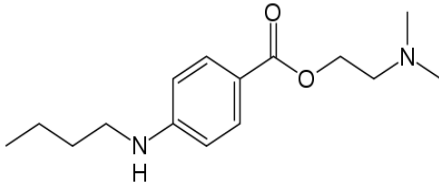
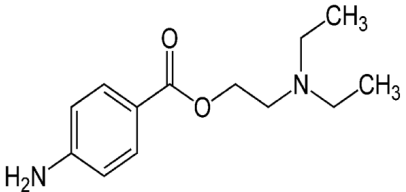
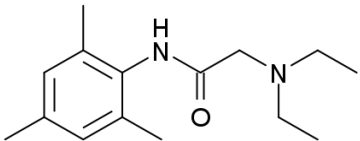
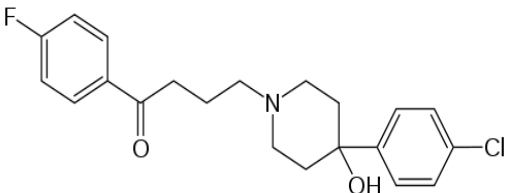
тов на различных видах животных продемонстрировало отсутствие токсичности и мутагенного действия, а также хорошую переносимость препаратов.

«Липосом Форте» представляет собой липосомальную форму фосфолипидов базальных ядер гипоталамуса новорожденных животных (свиней). Препарат выпускают в ампулах по 2 мл, содержащих 28 мг фосфолипидов мозга. В качестве вспомогательных веществ используются: маннитол, эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, фосфаты натрия, вода для инъекций. Препарат вводят внутривенно или внутримышечно. *Показаниями к применению* является: терапия метаболической аномалии в результате церебрально нейроэндокринного расстройства. Кроме того, установлена эффективность «Липосом Форте» как вспомогательного средства при болезни Паркинсона. Введение препарата увеличивает активность гипоталамуса за счет активации метаболизма дофамина, тирозингидролазы и аденилатциклазы. Так же препарат «Липосом Форте» применяли для лечения синдрома тревожности и депрессии, связанного с менопаузой. Исследования проводили на 64 женщинах различного возраста. Пациенты были разделены на две группы: одна получала традиционное лечение, другая дополнительно получала липосомальный препарат. Эффективность оценивали по шкале тревоги. Установлена эффективность и безопасность препарата при лечении депрессивных психозов у женщин. В контрольной группе эффективность снятия тревожности и депрессивного состояния была ниже.

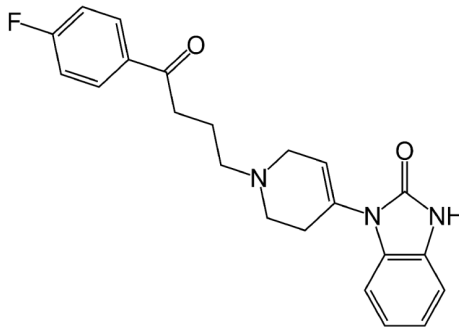
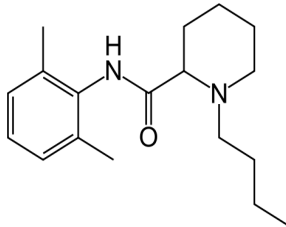
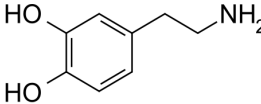
«Трикортин-1000» представляет собой липосомальную форму фосфолипидов коры головного мозга новорожденных животных (свиней). Препарат выпускают в ампулах по 2 мл, содержащих 24 мг фосфолипидов мозга и цианкобаламин в количестве 1 мг. В качестве вспомогательных веществ используются: лидокаина гидрохлорид, эфиры п-гидроксibenзойной кислоты, фосфаты натрия, вода для инъекций. Препарат вводят внутривенно или внутримышечно. *Показаниями к применению* является: терапия метаболической аномалии нервной системы при черепно-мозговых травмах, синдроме невроза – головной боли при эндогенной и экзогенной интоксикации, алкогольного полиневрита.

В табл. 9 показана химическая структура нейротропных препаратов.

Таблица 9 – Химическая структура нейротропных препаратов

Нейротропный препарат	Химическая структура
1	2
Аминазин	
Дикаин	
Новокаин	
Тримекаин	
Галоперидол	

Продолжение таблицы 9

1	2
Дроперидол	
Бупивокаин	
Допамин	

3.9. Липосомальные формы лекарственных препаратов в стоматологии

Пародонтит – воспаление тканей пародонта, характеризующееся деструкцией пародонта и кости. Для пародонтита характерно поражение глубоких структур опорного аппарата зуба, включающих пародонтальные связки, цемент корня и кость альвеолы, сочетающиеся с их деструкцией. Повреждение пародонтальных связок и резорбция альвеолярной кости способствует прорастанию десневого эпителия вдоль корня зуба и образованию патологического зубодесневого кармана. Современный уровень знаний об этиологии

этого заболевания определяет следующие причины возникновения пародонтита:

- сублингвальная пародонтальная микрофлора – постоянный контакт микрофлоры в десневых карманах вызывает состояние гиперсенсibilизации, изменение иммунологической реактивности организма, возникновение аутоиммунных процессов, вызывающих выраженные изменения пародонта;
- атеросклеротические изменения сосудов – у пациентов с цереброваскулярными и кардиоваскулярными заболеваниями в подавляющем большинстве случаев пародонтит начинается с нарушения соединяющего эпителия в пародонте;
- активация процессов свободно-радикального окисления – развивающаяся гипоксия пародонта, диффузия продуктов свободно-радикального окисления из мягких тканей приводит к вторичной вспышке перекисного окисления липидов в костной ткани.

Оценивая причины возникновения пародонтита, мы посчитали целесообразным использование липосомальной формы препарата, обладающего мембранопротекторным, антиоксидантным и антибактериальным действием. Для проведения исследований нами были использованы два липосомальных препарата «Липин» и «Липозэф», представляющий собой липосомальную форму эффективного антибактериального препарата растительного происхождения – хлорофиллипта. Липосомы в двух препаратах были получены из высокоочищенного фосфатидилхолина яичного желтка. Средний размер липосом около 120–140 нм. Были использованы две модели пародонта: модель снижения жевательной функции и модель пародонтита индуцированного эндотоксином. Для оценки эффективности действия препаратов проводили визуальную клиническую оценку состояния тканей пародонта, определение морфометрических показателей в макропрепаратах и гистометрических показателей в микропрепаратах верхней и нижней челюсти крыс с экспериментальным пародонтитом. Применение «Липина» улучшало клиническое состояние зубочелюстной системы. У всех животных исчезла отечность слизистой оболочки ротовой полости на 34 %, снизилась гиперемия десен. Под влиянием «Липина» достоверно уменьшилось оголение корней зубов относительно данного уровня в нелеченном контроле. Причем, показатель, характеризующий обнажение корней моляров, не отличался от уровня в норме. «Ли-

пин» предотвращал деструктивные процессы в тканях пародонта, что подтверждается уменьшением в 4,3 раза показателя степени рассасывания альвеолярных отростков. Применение «Липина» полностью устраняет резорбцию стенок зубной альвеолы I моляра нижней челюсти, I и II моляров верхней челюсти крыс. Использование «Липозэфа» приводило к аналогичным результатам. Как показали гистологические исследования после лечебно-профилактического введения «Липина» и «Липозэфа» выраженность патологических процессов в мягких и твердых тканях пародонта существенно снижалась. Под влиянием «Липина» и «Липозэфа» глубина патологических зубодесневых карманов уменьшилась на 81,0 и 95,6 %, соответственно. Уровень эпителиального прикрепления находился на уровне или выше эмалево-цементной границы на 80–86 % случаев после лечения обоими препаратами. Дистрофических и воспалительных изменений в десневом эпителии и эпителии в области кармана отмечено не было. Препараты оказали менее выраженный эффект на течение патологического процесса в костной ткани, что может быть связано с глубиной индуцированной эндотоксином деструкции этого звена пародонта. В отношении показателей кальций-фосфорного обмена наибольшую эффективность проявил «Липозэф», который статистически достоверно снижал уровень кальция и нормализовал концентрацию фосфора в крови до уровня интактного контроля. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о существенной пародонто-протекторной активности липосомальных препаратов («Липина» и «Липозэфа»), которая обусловлена их антиоксидантным, антигипоксическим, мембраностабилизирующим и антибактериальным действием. Применение препаратов приводит к нормализации тканевого дыхания, вызывая усиление процессов регенерации пародонтальных структур.

Проведено изучение эффективности «Липина» в комплексном лечении генерализованного пародонтита. Под наблюдением находилось 120 пациентов, которые были разделены на 3 группы: 40 человек больных хроническим генерализованным пародонтитом легкой степени тяжести; 40 человек больных хроническим генерализованным пародонтитом средней степени тяжести; контролем служили 40 больных, разделенных на 2 аналогичные группы. Больным первых двух групп дополнительно проводили инъекции «Липина» в переходную складку верхней и нижней челюсти. Использование препарата

приводило к значительному снижению воспаления тканей пародонта без дополнительного использования массивного арсенала лекарственных средств. Сроки ликвидации клинических симптомов воспаления у больных в основных группах оказались значительно короче, чем в контрольных. После лечения с применением «Липина» выявлен стабильный позитивный эффект. Кровоточивость десен прекращалась уже на третьей процедуре. В процессе ликвидации воспалительных изменений в тканях пародонта уменьшилась глубина пародонтальных карманов и подвижность зубов. Нормализация процессов перекисного окисления липидов проявляется снижением содержания малонового диальдегида в крови. Данный метод лечения является весьма перспективным для работы с больными пародонтитом различной степени тяжести. Лечение липосомами имело стабильный позитивный эффект: улучшалась микроциркуляция в тканях пародонта, что способствовало прекращению кровоточивости десен; уменьшалась глубина и микробная обсемененность пародонтальных карманов и устранялась подвижность зубов.

Для использования в стоматологии предложены липосомы с гидроксипропиловым пропионом и лизином. Препараты вводились в ткань пародонта больным пародонтозом посредством аппликаций. Проведено 5 курсов по 12 процедур с недельным перерывом. В результате лечения состояние десен улучшилось, уменьшились воспалительные явления и кровоточивость. В стоматологии также используется гель-спрей «Дентоник» (Россия), который представляет собой микрокапсулы, сформированные из соевого фосфатидилхолина и содержащие антигипоксант (гипоксен), а также комплекс растительных экстрактов из корня солодки, сока алоэ, шалфея и других растений.

3.10. Липосомальные формы лекарственных препаратов в кардиологии

Исходя из роли процессов перекисного окисления в формировании сердечно-сосудистой патологии, липосомы могут быть успешно использованы для предотвращения свободно-радикального окисления в клетках, проявляя антиоксидантное действие.

В настоящее время проводятся исследования лекарственных препаратов, включенных в липосомы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

Впервые для лечения сердечно-сосудистых заболеваний был использован липосомальный препарат «Липин». Сегодня препарат рекомендован для лечения острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии.

Применение препарата «Липин» в раннем периоде инфаркта миокарда значительно снижает риск развития небезопасных нарушений ритма желудочка, повышает эффективность и безопасность лечения наиболее тяжелой категории больных. Липин снижает процессы перекисного окисления, поддерживает активность антиоксидантных систем организма, проявляет мембранопротекторное действие. У больных, которым для уменьшения негативного действия реперфузии вводился «Липин» не было отмечено нарушений ритма сердца, проявлений сердечной недостаточности, случаев развития аневризм. Использование препарата может повысить эффективность лечения и безопасность тромболитической терапии у больных пожилого возраста. В условиях экспериментальной послеишемической реперфузии миокарда собак установлено, что введение «Липина» существенно снижало гемодинамические нарушения и структурную деградацию кардиомиоцитов. Механизм антигипоксического действия липосом, по мнению авторов, может быть обусловлен тем, что фосфолипиды липосом являются конкурентным субстратом для фосфолипаз и продуцентов продуктов перекисного окисления. При этом фосфолипиды мышечных клеток остаются неповрежденными. По мнению авторов, существует определенная тропность фосфатидилхолиновых липосом к ишемической ткани. Таким образом, предложено *использовать «Липин» в качестве кардиопротектора в лечении инфаркта миокарда.*

Для проведения исследований использовали три вида липосом: пустые липосомы; липосомы, содержащие во внутренней фазе АТФ и креатинфосфат; липосомы с антиоксидантами, в липидную фазу которых включали α -токоферол, а внутренняя фаза содержала супероксиддисмутазу. Эксперименты проводили на крысах линии Вистар. Использовали два способа введения липосом: интракоронарное введение липосом в ишемизированный миокард и предварительное системное введение липосом в хвостовую вену. Системное и интракоронарное введение липосомальных препаратов, содержащих антиоксиданты, способствовало меньшему по сравнению с контролем снижению показателей сократительной функции сердца после тотальной ишемии и реперфузии, приводило к увеличению силы сокращений в ответ на

введение адреналина, уменьшению длительности периода реперфузионных аритмий и снижению активности лактатдегидрогеназы в перфузате.

Использование липосомальных форм препаратов в детской кардиологии ранее ограничивалась применением «Липина» в терапии гипоксических повреждений миокарда у новорожденных. Авторами в эксперименте и в клинике получены результаты, свидетельствующие о патогенетической обоснованности применения и *эффективности «Липина» при гипоксическом ишемическом поражении сердца новорожденных*. Применение «Липина» в комплексной терапии гипоксических повреждений привело к ликвидации дисметаболизма сердечной мышцы за счет нормализации проницаемости клеточных мембран, о чем свидетельствуют результаты лечения «Липином» физиологического уровня процесса перекисного окисления липидов, а также активности кардиоспецифического изофермента креатинфосфокиназы, рассматриваемой в качестве маркера стабильности мембран кардиомиоцитов, так как повышение активности фермента рассматривается как проявление нарушения целостности мембраны кардиомиоцитов.

Использование антиаритмических препаратов при инфаркте миокарда небезопасно в связи с наличием у них побочных эффектов, а ряду пациентов вообще противопоказано. Больным, которые поступили в стационар в первые 6 часов после развития болевого синдрома непосредственно после поступления, а затем каждые 6 часов на протяжении 5 дней внутривенно струйно вводили по 1000 мг препарата «Липин». Контрольной группе из 15 человек проводили традиционную терапию при инфаркте миокарда – нитраты и β -адреноблокаторы. По результатам исследования установлено, что в основной группе не отмечено обнаружения серьезных аритмий, кроме желудочной экстрасистолии невысоких градаций (Z-I) у 2-х больных (10 %). В контрольной группе у 5-ти больных (33 %) были зарегистрированы желудочковые нарушения ритма сердца (Z-II-III), что потребовало применения антиаритмических препаратов. Таким образом, применение препарата «Липин» в раннем периоде инфаркта миокарда значительно снижает риск развития небезопасных нарушений ритма желудочка, повышает эффективность и безопасность лечения наиболее тяжелой категории больных. «Липин» снижает процессы перекисного окисления, поддерживает активность антиоксидантных систем организма, проявляет мембранопротекторное действие. У боль-

ных, которым для уменьшения негативного действия реперфузии вводился «Липин», не было отмечено нарушений ритма сердца, проявлений сердечной недостаточности, случаев развития аневризмы. Использование препарата может повысить эффективность лечения и безопасность тромболитической терапии у больных пожилого возраста.

Последние годы на рынок Украины выведен препарат «Липофлавон», представляющий собой липосомальную форму биофлавоноида – кверцетина. В состав препарата на один флакон входят: кверцетин – 15,0 мг, фосфатидилхолин яичного желтка – 550 мг, лактоза – 550 мг. Препарат выпускают в лиофилизированном виде с растворителем. Препарат «Липофлавон» зарегистрирован в Украине в 2006 году. Известно, что *препараты кверцетина существенно уменьшают как гемодинамические нарушения, так и объем некротического повреждения при острой ишемии и реперфузии миокарда*. Этот эффект обусловлен мембраностабилизирующим действием кверцетина, о чем свидетельствует резкое торможение дегградации мембранных ферментов в ишемизированном миокарде, а также торможение активности липоксигеназ и неферментных прооксидантных реакций. Существует мнение, что важным фактором, определяющим кардиопротекторные свойства кверцетина, является его способность повышать уровень оксида азота в тканях и эндотелии миокарда. Этот эффект был экспериментально доказан в опытах на культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека и в экспериментах *in vivo* с прямым определением уровня оксида азота в миокарде и стенке сосудов кролика и при моделировании процессов ишемии / реперфузии миокарда у собак. Сложность использования кверцетина в клинике прежде всего связано с его гидрофобностью. Создание «Липофлавона» как липосомальной формы кверцетина позволило решить эту проблему. *Эффективность «Липофлавона» была показана при лечении острого инфаркта, нестабильной стенокардии, а также реперфузионных нарушений при тромболитической терапии*. У экспериментальных животных на модели острого инфаркта внутривенное введение «Липофлавона» приводило к стабилизации электрической активности сердца, улучшению коронарного кровообращения и уменьшению зоны некроза в два раза. Препарат производил выраженный противоаритмический эффект. По-видимому, терапевтический эффект «Липофлавона» обусловлен комплексным действием компонентов препарата и его липосомальной струк-

турой: блокадой липооксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты за счет присутствия в препарате кверцетина, а также антигипоксическим, антиоксидантным и мембранопротекторным действием фосфатидилхолиновых липосом. Установлена безопасность и отсутствие побочных реакций (аллергических, иммунотоксичных, местно-раздражающего действия) при введении препарата. При исследовании ишемической болезни сердца установлено, что терапия «Липофлавоном» больных в течение 7 дней приводит к клиническому улучшению течения заболевания: уменьшению тяжести частоты приступов стенокардии, уменьшению объема необходимой поддерживающей терапии, в том числе, антигипертензивных препаратов. «Липофлавон» обладает антиагрегатными, эндотелиопротекторными свойствами, улучшает реологические свойства крови и кровотока в микрососудах. Проведены экспериментальные исследования по влиянию «Липофлавона» на функциональную активность Ca^{+2} зависимых K^{+} каналов большой проводимости в гладких мышечных клетках аорты крыс после действия ионизирующего излучения с дозой 0,833 Гр/мин (доза 6 Гр). Установлено, что радиация приводит к существенному угнетению выходящего тока через каналы. Применение «Липофлавона» в дозах 100 мкг/мл фосфатидилхолина и 3 мкг/мл кверцетина вызывало восстановление прохождения тока через каналы. Проведены исследования *эффективности «Липофлавона» в комбинации с другим известным антигипоксантом – ацелизином в условиях экспериментальной хронической сердечной недостаточности*. Предметом исследования было изучение влияния приведенной комбинации на состояние энергетических ресурсов, активности ферментов энергетического метаболизма – лактатдегидрогеназы и креатинфосфокиназы. Было показано, что использование липосомальной формы кверцетина в комбинации с ацелизином позволяет на 7 сутки наблюдения существенно снизить в сыворотке крови и миокарде интенсивность свободнорадикального окисления. Лечение позволяет предупредить снижение активности ферментов, таких как супероксидсмутаза и каталаза. Было установлено, что «Липофлавон» обладает антирадикальными и антиоксидантными свойствами.

Нельзя не остановиться еще на одном вопросе применения препарата «Липофлавон», а именно, *для предупреждения развития кардиологических осложнений у больных операбельным раком молочной железы, получавших*

лечение антрациклиновыми антибиотиками при раке молочной железы. Исследования проводили на 180 больных. Контроль основных показателей деятельности сердца проводился до и после каждого курса химиотерапии антрациклинами. Физиологическая активность сердца оценивалась на основании клинического анализа по динамике уровня кардиоспецифичных тропонинов, а также данных электрокардиографии. Установлено, что при введении больным «Липофлавона» наблюдается выраженный противоаритмический эффект во время химиотерапии по сравнению с группой контроля не получающей липосомальную форму кверцетина. Таким образом, добавление к базовой терапии антрациклинами «Липофлавона» весьма перспективно – снижается частота осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.

На основании проведенных исследований в клинике было рекомендовано применение «Липофлавона»: в комплексной терапии при остром инфаркте миокарда без патологического зубца Q и нестабильной стенокардии приводит к более быстрой положительной динамике активности МВ-фракции креатинфосфокиназы в сыворотке крови, препятствует повышению уровня противовоспалительного цитокина интерлейкина-8, способствует электрической стабильности миокарда; при лечении стабильной стенокардии способствует уменьшению тяжести приступов стенокардии, снижению агрегации тромбоцитов, улучшению реологических показателей крови (снижению вязкости крови и агрегации эритроцитов) и микроциркуляции.

3.11. Липосомы, содержащие металлы

Установлена гепатопротекторная активность липосомальных препаратов, содержащих комплексы металлов. Эксперименты проводили как на первичных культурах гепатоцитов животных, так и в опытах *in vivo* на фоне токсического поражения гепатоцитов крыс путем однократно внутривенного введения четыреххлористого углерода. Контакт культуры клеток гепатоцитов с металлолипосомами из фосфатидилхолина не приводит к выраженным изменениям структурно-функционального состояния интактных клеток. Для отдельных компонентов отмечено повреждающее действие, степень (a – отношение показателя к контролю) которого достигает для комплекса металла $a = 2,5$, а для липосом – $a = 3,0$; вплоть до множественного лизиса

клеток при максимальной использованной дозе – 2000 мкг/мл. При этом степень повреждающего действия металлолипосом не превышает 1,5. Цинковая пыль обуславливает резкие изменения состояния клеток: *a* достигает 3 при прямом контакте и продолжает нарастать после удаления повреждающего агента до 4. Обработка клеток металлолипосомами восстанавливает состояние клеток и *a* снижается до 1,5–2,5. Авторами показано, что металлолипосомы во всем диапазоне использованных доз не вызывают изменений формы и площади ядер контактирующих клеток, что свидетельствует об отсутствии мутагенного фактора в их воздействии на клетку. Показана большая эффективность липосом, содержащих алюминий, по сравнению с медьсодержащими препаратами. Аналогичные данные были получены при изучении металлолипосом *in vivo*. Установленное в условиях токсического поражения гепатоцитов интегрально нормализующее дозозависимое влияние фосфатидилхолиновых липосом, содержащих алюминий, отражает сумму регенераторных и адаптационно-компенсаторных факторов: восстановление архитектоники печени на фоне резкого уменьшения некротических проявлений; активизацию обменных процессов. Пролонгирующее действие препаратов оценивалось по длительности катаlepsии. Галоперидол и дроперидол вводили внутривентриально мышам в дозе 25 мг/кг. Длительность катаlepsии при введении свободных форм составляла 87 ± 40 мин и 133 ± 60 мин, соответственно. Таким образом, авторами установлено пролонгированное действие липосомальных форм нейротропных препаратов. Кроме того, после введения галоперидола в чистом виде мышам катаlepsия наступала после кратковременного, но ярко выраженного судорожного припадка.

Включение в липосомы из дистеароилфосфатидилхолина и холестерина водонерастворимых аморфных комплексов металлов (хрома, алюминия, ванадия, марганца и других липофильных комплексов) позволило создать терапевтические средства различной направленности.

Сравнение влияния на некоторые показатели функциональной активности печени изучали на модели острого токсического гепатита, который вызывали подкожным введением крысам масляного раствора тетрахлорметана. В качестве гепатопротекторов использовали эссенциале, силибор, антраль, супероксидсмутазу, а также препарат «Лиолив», полученный на основе фосфатидилхолина и комплекса алюминия с *n*-2,3-диметилфениланрани-

ловой кислотой. Установлено, что именно «Лиолив» в большей степени проявляет антиоксидантные и антицитолитические свойства. Так, например, содержание малонового диальдегида и маркерных аминотрансфераз возросло минимально по сравнению с использованием других гепатопротекторных препаратов. Авторы предполагают использование липосомального препарата «Лиолив» в качестве оригинального высокоэффективного гепатопротектора, действие которого основано на высоком антиоксидантном эффекте.

По результатам доклинического изучения установлено, что «Лиолив» при парентеральном и энтеральном путях введения при экспериментальном поражении печени различными гепатотоксинами и их комбинациями способствует повышению выживаемости экспериментальных животных, нормализации активности микросомальных ферментов и трансаминаз сыворотки крови, ослабляет действие гепатотоксинов, активизирует репаративные процессы в гепатоцитах, обмен веществ в клетке, результатом чего является нормализация белковосинтетической и липотропной функции печени. О положительном влиянии «Лиолива» на течение острого поражения печени свидетельствуют данные патоморфологических исследований печени, отражающие резкое уменьшение дистрофических изменений и усиление процессов регенерации гепатоцитов. Гепатозащитное действие препарата обусловлено ингибированием процессов перекисного окисления липидов, поддержкой эндогенных антиоксидантных систем организма, стабилизацией структуры печени и мембран гепатоцитов, а также функцией неспецифической детоксикации. По данным фармакокинетических исследований, «Лиолив» как липосомальная композиция сохраняет структурную целостность в кровеносном русле и тканях, а также преимущественно накапливается в печени и селезенке, что подтверждает гепатоспецифичность препарата и соответствует закономерностям фармакокинетики липосомальных средств. Наряду с гепатозащитным эффектом, «Лиолив» проявляет выраженное пролонгированное противовоспалительное действие. Клинические исследования «Лиолива» при лечении больных с острым вирусным гепатитом С показали высокие гепатопротекторные свойства препарата. «Лиолив» способствует более быстрой регрессии клинических проявлений болезни, в том числе интоксикационного и диспептического синдромов, более раннему наступлению желчного криза, существенно улучшает качество жизни пациентов. Препарат обладает выра-

женными дезинтоксикационными свойствами, положительно влияет на динамику основных биохимических показателей функций печени, приводит к уменьшению проявлений основных цитолитического, мезенхимально-воспалительного и холестатического синдромов.

Проведено изучение клинических особенностей, показателей функционального состояния печени, аминокислотного состава сыворотки крови, свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты, клеточного и гуморального иммунитета у больных острым и хроническим алкогольными гепатитами. Лечение проводили при использовании витаминного комплекса «Триовит», высокобелковой диеты и препарата «Лиолив». В контрольной группе больных использовали высокобелковую диету и «Триовит». В группе больных, в которой применяли «Лиолив» обнаруживали нормализацию показателей щелочной фосфатазы, АЛТ, АСТ. В контрольной группе динамика нормализации активности ферментов была значительно менее выражена.

3.12. Липосомальные формы препаратов гепарина

Гепарин (от греч. *hepar* – печень), вещество, препятствующее свёртыванию крови; впервые выделен из печени. Синтезируется в тучных клетках, скопления которых находятся в органах животных, особенно в печени, лёгких, стенках сосудов.

Препараты на основе гепаринов сегодня хорошо известны и, трудно представить профилактику и лечение патологических поражений сосудов и тканей без этой группы биологически активных соединений. Известно, что гепарины применяют для лечения большого числа заболеваний: тромбозы и тромбоземболии, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда, гломерулонефрита и ряда других патологических состояний. Препараты гепарина вводят человеку в виде инъекций, гелей, мазей и др. Препараты гепарина представляют собой гетерогенную смесь сульфатированных мукополисахаридов с различными молекулярными массами. Однако при использовании низкомолекулярных гепаринов наблюдаются побочные эффекты: геморрагические осложнения, местные или генерализованные аллергические реакции, тромбоцитопения, повышение активности трансаминаз и др. Для уменьшения побочных эффектов и повышения специфического действия начаты ра-

боты по созданию липосомальных форм гепарина. *Включение низкомолекулярного гепарина в липосомы в инъекционной форме приводит к снижению коагуляции и более длительному пребыванию гепарина в крови.* Эффективность использования антикоагулянта в значительной степени зависит от состава липосом, их размера и заряда. Сегодня созданы коммерческие липосомальные препараты в форме геля-спрея, содержащие гепарин. Преодоление барьерной функции кожи представляет достаточно серьезную проблему. Для большей эффективности применения гепарина для наружного использования предложено включить гепарин в липосомы. При введении липосомальных форм гепарина обнаружено увеличение гепаринизации отдельных слоев кожи. При этом не обнаружено значительного проникновения гепарина в системный кровоток. Коммерческие липосомальные препараты, выпускаемые сегодня такие как «Виатромб» («Фабрил Фарма», Германия), («Mika Pharma GmbH»), «Виатромб-форте» (Чехия), «LipoHer» (Польша) осуществляют эффективный транспорт через кожный барьер.

В состав препарата «Виатромб» (25 мл) входят 0,4 г гепарина натрия (60000 ME), соевый фосфатидилхолин (Phospholipin 80) – 2,4975 г, этанол (96 %) – 4,2 г, калия дигидрофосфат – 0,13 г, натрий едкий – 0,01 г, вода очищенная – 17,76 г. Препарат представляет собой опалесцирующую жидкость с характерным запахом фосфатидилхолина. Фармакологическая активность препарата проявлялась в антикоагулянтном, противовоспалительном и противовоспалительном действии. Т 1/2 (параметр, который определяет частоту приема препарата) в плазме крови приблизительно 1–2 часа. В крови препарат связывается белками плазмы и не проходит через плацентарный барьер и не обнаруживается в молоке у кормящих женщин. Липосомы гарантировали высокий уровень проникновения гепарина через кожу и одновременно проявляли высокую совместимость с кожей. В клинических исследованиях доказана эффективность гепарина в липосомальной форме, что проявлялось в увеличении кровотока в коже. Препарат стимулирует репарацию поврежденного эндотелия сосудов. Показаниями к применению «Виатромба» являются: венозный варикоз, поверхностный тромбофлебит, венозные отеки и язвы нижних конечностей, поверхностные гематомы и ушибы, полученные после травм и аварий. Пациентам (42 человека) с повышенным венозным тромбозом вводили липосомальную и свободную форму (контроль) низкомолеку-

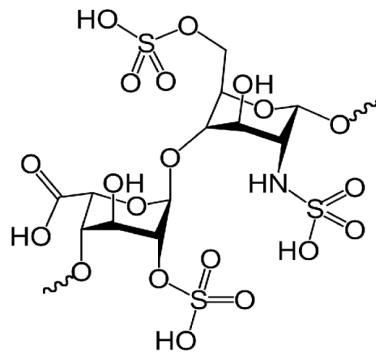
Контрольные вопросы

лярного гепарина. Проведенные исследования установили более высокую антикоагулянтную активность гепарина, инкапсулированного в липосомы и подтвердили отсутствие побочного действия.

В последнее время появляются сообщения о возможности использования аэрозольных липосомальных форм низкомолекулярного гепарина. Липосомы были получены из 1,2-диолеил-3-триметиламмония-пропана, холестерина и 1,2-дистеароил-sn- глицеро-3-фосфатидил-этаноламин-N-метокси (полиэтиленгликоль-2000). Размер липосом составлял от 100 до 150 нм. Эффективность включения составляла $73,4 \pm 19,1$ % при сравнении с инъекционным введением свободной формы низкомолекулярного гепарина. При применении липосомального спрея 1–2 раза в день установлен тромболитический эффект аналогичный эффекту, полученному при подкожном введении свободного раствора низкомолекулярного гепарина. Время нахождения гепарина при введении липосомальной формы составляло $10,6 \pm 0,2$ часа, что в два раза превышает время нахождения гепарина при использовании его свободной формы.

Использование липосомальных форм препаратов, содержащих гепарины, позволяет уменьшить проявление побочных эффектов, повысить терапевтическую эффективность и уменьшить используемую дозу.

На рис. 28 показано химическое строение низкомолекулярного гепарина.



Гепарин (мономер)

Рисунок 28 – Химическое строение низкомолекулярного гепарина

1. Объяснить какими преимуществами обладают липосомы, содержащие лекарственные субстанции.

2. Как влияет на фармакологические свойства противоопухолевых препаратов, включение их в липосомальные частицы?

3. Необходимо объяснить, с чем может быть связано преодоление лекарственной резистентности при использовании липосомальных противоопухолевых препаратов на примере антрациклиновых антибиотиков.

4. Чем отличается структура сосудов в нормальных и опухолевых тканях? В чем преимущества использования искусственных мембран – липосом?

5. Опишите основные противомикробные соединения, которые включены в состав липосом. Укажите преимущества липосомальных форм антибиотиков.

6. Приведите основные свойства ненагруженных липосом на примере препарата «Липин». Опишите роль «Липина» в процессах репарации биологических мембран.

7. Указать роль липосом в переносе кислорода и возможность их использования в процессах улучшения оксигенации крови.

8. Описать процесс фотодинамической терапии, роли синглетного кислорода и примеры использования липосом.

9. В чем проявляются антиоксидантные свойства липосом в кардиологии, офтальмологии и пульмонологии? Привести примеры использования биофлавоноидов.

10. Докажите на конкретных примерах фармакологическую эффективность липосом для восстановления функции дыхания.

11. Предложите схему получения липосомального препарата, содержащего гормоны. Опишите преимущества данной лекарственной формы.

12. Докажите преимущества липосомальных форм препаратов в форме спрея, например, гормона – инсулина.

13. Какими физико-химическими свойствами липидов определяется их выбор в составе искусственных мембран?

14. Докажите на конкретных примерах фармакологическую эффективность металоллипосом.

15. Каковы на Ваш взгляд перспективы развития биотехнологического производства липосомальных лекарственных препаратов?

ГЛАВА 4. ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ ФОРМЫ АДЬЮВАНТОВ И ВАКЦИН

В настоящее время широкое распространение получили липосомальные препараты, которые используются в медицине по различным направлениям. Одно из таких направлений – *применение липосом в качестве адьювантов для конструирования вакцин*. Адьювантное действие липосом по отношению к различным антигенам установлено после введения экспериментальным животным антигенных субстанций, вирусов и бактерий, глобулинов и альбуминов сыворотки крови, ферментов.

Основной задачей получения антигенов, используемых в составе вакцин, является их высокая степень очистки от балластных примесей различной природы: белковых, липидных, липопротеидных, полисахаридных и других. Хорошо известно, что данные соединения способны усиливать иммуногенность вводимых веществ. В то же время их присутствие нежелательно в связи с усилением ими побочного действия вакцин. Именно этот факт заставляет использовать для конструирования вакцин иммуностимуляторы, получившие название – адьюванты. *К применению адьювантов в вакцинологии накладываются довольно жесткие требования:*

- ❖ адьюванты должны быть свободными от посторонних примесей и не вызывать побочных иммунных реакций;
- ❖ адьюванты не должны быть онкогенными или алергогенными веществами и вызывать появление соответствующих соединений в организме;
- ❖ адьюванты не должны содержать антигены, сходные с антигенами хозяина (появление таких антигенов может привести к аутоиммунным реакциям);
- ❖ после выполнения своих функций адьюванты должны достаточно легко метаболизироваться.

Усиление действия антигена в организме при введении его с адьювантами объясняется несколькими причинами:

- ✓ замедленной резорбцией антигена из образовавшегося на месте введения «депо», что способствует антигенному раздражению;

- ✓ воспалительной реакцией организма в ответ на введение адьювантов;
- ✓ образование комплекса антигена с адьювантом по типу химической связи, в результате чего повышается иммуногенность антигена;
- ✓ стимуляцией адьювантом фагоцитарной активности ретикулоэндотелиальной системы;
- ✓ общим усилением синтеза белка в организме;
- ✓ замедлением гидролиза антигена тканевыми ферментами;
- ✓ стрессорным действием адьюванта на организм;
- ✓ активацией системы комплемента;
- ✓ ускорением транспорта антигена к иммунокомпетентным клеткам;
- ✓ стимуляцией образования цитокинов;
- ✓ стимуляцией пролиферации, дифференцировки и функциональной активности Т- и В-клеток и их взаимодействия.

Большинство исследователей считают, что адьюванты оказывают комбинированное действие как на антиген, изменяя его физико-химические свойства и усиливая иммуногенность, так и непосредственно на организм, вызывая ряд неспецифических реакций. Влияние адьювантов на свойства антигена касается изменения его структуры, молекулярной массы, полимерности, растворимости и других физико-химических и иммунохимических свойств. Сегодня известно значительное количество адьювантов отличающихся происхождением (природные и синтетические) и физико-химическими свойствами:

1. Минеральные адьюванты;
2. Растительные адьюванты (сапонины, адьювант – QS21 выделен из южно-американского дерева *Quillaja Saponaria*. Иммуностимулирующий комплекс «ISCOM», представляет собой адьювантную фракцию *Quillaja Saponaria*, включенную в частицы, состоящие из холестерина, природных фосфолипидов и антигенов клеточных мембран. «ISCOM» вводили в состав вакцин против вируса гриппа, вируса папилломы человека, ВИЧ, возбудителя малярии, ряда опухолей и др. Показано, что ISCOM-содержащие вакцины наиболее эффективны при интраназальном применении и индуцируют смешанный Th-1 и Th-2 иммунный ответ);

3. Масляные адъюванты (адъювант Фрейнда, минеральные масла, животные и растительные масла);

4. Цитокины (например, интерлейкины ИЛ-1- α и ИЛ-1 β) и пептиды;

5. Микробные адъюванты: корпускулярные и субъединичные структуры, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, липополисахарид-белковые комплексы;

6. Синтетические вещества: полинуклеотиды (поли-А:У, поли-И:Ц и др.), пептиды (мурамилдипептид и его производные, полиэлектролиты – полианионы, поликатиониты);

7. Сложные искусственные адъювантные системы (липосомы, микрокапсулы).

В связи с вышеизложенным становится понятен значительный интерес, который возник в последнее десятилетие к липосомам, как перспективным адъювантным компонентам. Обращает на себя внимание тот факт, что липосомы отвечают большинству требований предъявляемых к адъювантам. Немаловажным является возможность получения вакцин с липосомальными адъювантами, которые могут легко подвергаться стерилизующей фильтрации, в отличие от минеральных сорбентов. Это в свою очередь позволяет проводить стерилизующую фильтрацию на каждом этапе получения вакцинных препаратов. Липосомы снижают токсичность встроенных антигенов и обладают хорошей биосовместимостью. Кроме того, появились исследования, в которых в составе вакцинных препаратов предложено использовать комбинацию из нескольких адъювантов: липосом, цитокинов, пептидов, иммуностимулирующих комплексов.

4.1. Противовирусные вакцины

Вакцины для профилактики гепатита

Полученные различными авторами данные свидетельствуют о том, что если введенные в водном растворе антигены приводят к отрицательному или очень слабому иммунному ответу, то инкапсулирование их в липосомы приводит к высоким титрам сыворотки крови. При подкожной инъекции морским свинкам поверхностного антигена вирусного гепатита получены высо-

кие титры антител, защищающих животных от инфекции гепатитом. Показано, что антиген вируса гепатита, включенный в липосомы, приводит к появлению антител в титрах в 750 раз больше, чем при иммунизации водным раствором антигена. Очищенные препараты антигена вируса гепатита включали в липосомы, состоящие из яичного фосфатидилхолина, холестерина и додецилфосфата в соотношении 7 : 2 : 1. Авторы признают за липосомами свойства адъювантов.

Несомненный интерес представляют данные о возможности изменения типа иммунной реакции при введении антигена в составе липосом. В качестве антигена использовали пептид вируса гепатита В (HbS Ag), введение которого мышам C57BL приводил к Th-2-типу реакции. Введение данного антигена в липосомах в присутствии иммуномодулятора показало сильную пролиферативную реакцию Т-лимфоцитов. Т-лимфоцитная подгруппа была идентифицирована как Th-1-тип на основании цитокинового профиля, который свидетельствовал о значительном выделении γ -интерферона (цитокин типа Th-1) и чрезвычайно низком уровне интерлейкина-4 (цитокин типа Th-2). Контрольная группа мышей C57BL, иммунизированная пептидом с квасцами, показала очень низкий уровень пролиферации Т-лимфоцитов, причем не отмечалось никакого увеличения в выделении γ -интерферона или интерлейкина-4. Таким образом, было установлено, что реакция типа Th-1 происходит у животных, которым вводили пептид только в составе липосом.

НераХеп[™] липосомальная вакцина для профилактики гепатита В производится фирмой «Liroxep». При применении этой вакцины уровень антител в 20 раз превышает уровень специфических антител по сравнению с использованием не липосомальной вакцины. В связи с этим появилась реальная возможность уменьшить профилактическую дозу вакцины и сократить количество инъекций.

Авторами получена липосомальная вакцина против гепатита В, в которую был инкапсулирован рекомбинантный поверхностный антиген гепатита В (HbS Ag) размером 22 нм. Липосомы получали из димиристоилфосфатидилхолина и димиристоилфосфатидилглицерина в молярном соотношении 9 : 1. Размер липосом после гидратации 4,5 мкм. При сравнении свободного HbS Ag, липосомальной вакцины и HbS Ag адсорбированного на геле гидро-

окси алюминия установлено, что липосомальный препарат приводил к более высокому уровню гуморального ответа (титр специфических антител).

Ерохал – вакцина для профилактики гепатита А. Препарат представляет собой фосфатидилхолиновые липосомы, содержащие вирус гепатита А, инактивированный формалином, и гемагглютинин вируса гриппа. Вакцина проявляла высокие иммуногенные свойства и безвредность при изучении на 117 волонтерах. При изучении уровня защитных антител в крови иммунизированных животных иммуноферментным анализом обнаружено, что сероконверсия на 14 и 28 день составляла 97 % и 98 %, соответственно. После второй инъекции липосомальной вакциной уровень сероконверсии составлял 100 %.

Фирма «Liroxep» разработала первую в мире вакцину для профилактики гепатита Е, содержащую рекомбинантный белок гепатита Е в липосомах, полученных по известной технологии Imuxep.

Вакцины для профилактики гриппа

Грипп и его осложнения дают существенную заболеваемость и смертность у пожилых людей. У людей молодого возраста иммуногенность при вакцинации обеспечивает 70–90 %-ую защиту, а у пожилых людей лишь около 50 %. Предложена липосомальная трехвалентная вакцина, содержащая по 15 мкг гемагглютинина каждого вирусного штамма и 33 мкг интерлейкина-2 человека. Проведено изучение иммуногенности и безвредности предложенной липосомальной вакцины при сравнении со стандартной коммерческой вакциной. Вакцины вводили внутримышечно людям пожилого возраста (средний возраст 80 лет). При изучении уровня защитных антител при помощи иммуноферментного анализа установлено присутствие защитного титра антител у 33 % людей при использовании стандартной вакцины и 48 % при иммунизации липосомальной вакциной. При этих исследованиях показана одинаковая безвредность вакцин, а иммуногенность была выше у липосомального препарата. Причем, антител к интерлейкину-2 не выявлено. Не обнаружено также увеличения уровня в крови иммунизированных антифосфолипидных антител.

Существующие вакцины против гриппа, применяемые в настоящее время, представляют собой преимущественно вакцины из инактивированного вируса.

Существует три вида вакцин:

- вакцины из цельного вируса;
- вакцины из фрагментированного вируса;
- вакцины на основе отдельных активных фрагментов вируса гриппа.

Для повышения иммуногенной активности данных вакцин используют как различные адьюванты (например, МГ59) так и липосомальные формы вакцин. Изучение безвредности и иммуногенности коммерческих противогриппозных вакцин проводили на двух группах больных. Первой группе вводили вакцину, содержащую гемагглютинин, выделенный из вируса, а второй группе лиц вводили вакцину, полученную путем введения гемагглютинина в мембрану липосом, состоящую из природного фосфатидилхолина. Для исследования использовали трехвалентную вакцину. Обе вакцины вызывали одинаковый достоверный подъем среднего титра противогемагглютининовых антител против всех трех компонентов вакцины через 1 месяц после иммунизации. Однако, достоверно большее количество лиц, иммунизированных липосомальной формой вакцины, демонстрировали более чем четырехкратное повышение титра против вируса штамма Сингапур и Пекин по сравнению со свободной вакциной. Процент больных, у которых титр при иммунизации липосомальной формой достигал защитной величины, был также значительно выше. Особое клиническое значение имел тот факт, что у 68,4 % лиц, иммунизированных липосомальной вакциной, достигался защитный уровень антител против всех трех компонентов вакцины, в отличие от 38 % при вакцинации обычной вакциной.

Многочисленные исследования липосомальных вакцин, содержащих вирус гриппа или его высокоочищенные компоненты, привели к созданию коммерческих липосомальных препаратов для профилактики гриппа. Одним из таких препаратов является вакцина «Инфлексал» производства Berna Biothech, Швейцария. Препарат представляет собой поливалентную липосомальную (виросомальную) инактивированную вакцину против гриппа, в со-

став которой входят поверхностные антигены трех штаммов вируса гриппа типов А и В. Вирусы инактивируют формальдегидом, после чего из вирусов выделяют и очищают антигены гемагглютинины и нейраминидазы. В одной дозе содержится по 15 мкг гемагглютинина каждого штамма. Липосомы получают из фосфатидилхолина, содержание которого в одной дозе препарата (0,5 мл) – 117 мкг.

Вирусы гриппа постоянно изменяются, поэтому состав вакцины, выпускаемой в разные годы, может отличаться. Преимуществом виросом является возможность имитации ими вирусных частиц. Механизм действия виросом можно представить следующим образом: фагоцитоз виросом иммунокомпетентными клетками; презентация антигенов, включенных в липосому (гемагглютинины и нейраминидаза) иммунной системе; активация CD4+ хелперов для выработки цитокинов; цитокины стимулируют клетки В для выработки антител к антигенам вируса гриппа. Защитный уровень антител в крови обычно достигается через 2–3 недели после вакцинации. Длительность поствакцинального иммунитета составляет 6–12 месяцев.

Вакцина для профилактики герпеса

Вирус простого герпеса-2 (HSV2) является наиболее распространенным возбудителем герпеса половых органов. Предложена липосомальная вакцина, содержащая пептиды, выделенные из вируса герпеса. В модельных экспериментах на мышах зараженных вирусом герпеса (самки заражены интравагинально, самцы – интаректально) однократное введение липосомальной вакцины приводило к 86–100 % выживаемости при интравагинальном заражении и 71–100 % при интаректальном заражении мышей. Различные по составу пептиды вируса герпеса обладали различной иммуногенной активностью.

LipoRab™ – вакцина для профилактики бешенства. Повышает иммуногенность липосом с включенным в них вирусом бешенства. Преимуществом этой вакцины является возможность уменьшения доз и количества инъекций.

4.2. Антибактериальные вакцины

Вакцины, содержащие токсины и анатоксины

Внутривенное введение водного раствора *дифтерийного анатоксина* сенсibilизированным мышам приводило к гибели 70 % животных в течение 1 минуты, а у 30 % мышей наблюдались симптомы тяжелой формы сывороточной болезни. Животные, иммунизированные анатоксином, заключенным в липосомы, выжили, и у них отсутствовали симптомы сывороточной болезни. У сенсibilизированных дифтерийным анатоксином животных после подкожного введения липосомального препарата антигена не наблюдается феномен Артюса.

Проведены исследования иммуногенности *анатоксинов Edcmatiens*, заключенных в липосомы различного состава. Наибольшая выживаемость была в группе животных, иммунизированных липосомами, в состав которых входили яичный фосфатидилхолин, кардиолипин, выделенный из сердца крупного рогатого скота, а также фосфатидилсерин и сфингомиелин, выделенные из мозга крупного рогатого скота. Так как липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и кардиолипина, связывают белки класса FIE больше, чем фосфатидилхолиновые липосомы, то, вероятно, их большая иммуногенность связана с присутствием кислого фосфолипида – одного из немногих антигенных липидных веществ. Так как сфингомиелину приписывают важные функции в генетическом аппарате клетки как неспецифическому активатору синтеза нуклеиновых кислот, то можно предположить, что сфингомиелин входящий в липосомы и проникающий вместе с антигеном в иммунокомпетентную ткань организма, приводит к увеличению синтеза антител против антигенов анатоксина. При использовании липидов в неозвученном состоянии не удавалось получить значительного увеличения иммунного ответа.

Столбнячный очищенный анатоксин конъюгировали с липосомами с помощью глутарового альдегида. Полученный препарат вводили внутрибрюшинно мышам BALB/c. Установлено, что иммунизация приводит к появлению высокого уровня противостолбнячных G-иммуноглобулинов. Одновременно показано, что содержание специфических противостолбнячных иммуноглобулинов класса E было весьма незначительным. Полученные сыворотки содержали защитный титр антител, т.к. введение летальных доз ток-

сина (100 dlm) полностью защищало животных от гибели. Иммунизация животных свободным раствором столбнячного анатоксина или анатоксина, сорбированного на геле гидроокиси алюминия, вызывали образование иммуноглобулинов как класса G, так и класса E. Более того, повторная иммунизация мышей липосомальной формой столбнячного анатоксина после первичной иммунизации сорбированным антигеном приводила к появлению, в основном, иммуноглобулина G. При лиофилизации липосомальной формы антигена, иммуногенность препарата сохранялась в течение 6 месяцев при 37 °С.

На мышах BALB/c изучали влияние различных липосом, состоящих из фосфолипидов и холестерина, взятых в эквимолярных соотношениях, на иммуногенные свойства встроенного столбнячного анатоксина. Антитела определялись при помощи иммуноферментного метода. В результате установлено, что адъювантные свойства липосом наиболее выражены при соотношении фосфолипидов к столбнячному анатоксину по массе 2050 : 1; увеличение соотношения между белковой фракцией и липосомами приводило к значительному снижению титров. Уровень антител не изменяется при использовании липосом, состоящих из фосфолипидов с температурой фазового перехода – гель-жидкость от 32 °С до 41,5 °С. При изучении адъювантных свойств липосом на иммунитет столбнячного анатоксина использовали два метода включения в состав липосом: методом дегидратации – регидратации и ковалентным связыванием. Авторы не установили различий в действии препаратов на гуморальный иммунный ответ. Отмечено, что 82,3 % антигена связывается с липосомами независимо от их заряда – нейтрального, отрицательного или положительного. Обнаружены отличия в связывании с антигеном липосом, содержащих жирные кислоты различной степени насыщенности.

Проведено изучение *липосомальной комбинированной вакцины, содержащей анатоксины: дифтерийный и столбнячный*. Липосомы были получены ультразвуковой обработкой смеси липидов, состоящей из соевого фосфатидилхолина и холестерина. В 1 мл вакцины содержалось по 5 Lf каждого анатоксина. Мышам BALB/c препарат вводили подкожно. Установлено, что максимальное включение анатоксинов в липосомы было при соотношении фосфатидилхолин : холестерин – 7 : 3: дифтерийного анатоксина 39,8 % и столбнячного анатоксина 38,7 %. Антитела в крови животных определяли иммуноферментным анализом на 15, 30 и 45 день. Установлено, что комби-

нированное использование анатоксинов в вакцине приводит к более высокому уровню антител к столбнячному антигену по сравнению с монолипосомальной вакциной, содержащей столбнячный анатоксин. В уровне антител дифтерийного анатоксина различий не выявлено.

Установлено, что *холерный токсин и его В-субъединица* повышали иммунный ответ к антигенам при совместном проникновении через слизистую оболочку. При оральном введении антигенов, находящихся на поверхности малых фосфатидилхолиновых липосом наблюдалось увеличение иммунного ответа. Для изучения протективных свойств холерных вакцин добровольцам перорально вводили трехкомпонентную липосомальную холерную вакцину. В качестве контроля пациентам вводили свободную форму трехкомпонентной вакцины. Обе вакцины обеспечивали 100 % иммуногенность, что было подтверждено по наличию защитного титра антител в крови пациентов. В то же время, вакцинированные люди, получившие антигены в липосомах, продемонстрировали более высокую скорость антигенспецифической реакции антител, чем пациенты, получавшие свободную форму вакцины. На возможность использования липосомальной холерной вакцины указывают и другие авторы, где в качестве антигена использовали инактивированные теплом цельные клетки холерных вибрионов. Использование липосомальных вакцин приводило к торможению процесса колониеобразований на слизистой оболочке у крыс.

Вакцины, содержащие липид А

Несомненно, весьма перспективным является использование липосом как контейнеров для адъювантов различной структуры. Одним из таких адъювантов является *липид А, представляющий собой липополисахарид, выделенный из грамотрицательных бактерий*. Высокая адъювантная активность липида А установлена за последние 10–15 лет многочисленными исследованиями. Однако применение вакцин, в составе которых в качестве адъюванта используется липид А, тормозится его высокой пирогенной активностью. Введение липида А в состав липосом значительно уменьшает пирогенность липополисахарида. Так, например, липид А, выделенный из *S. minnesota R 595* и инкапсулированный в липосомы, проявлял меньшую пирогенность

по сравнению со свободной формой липида А. Так, непирогенная доза липида А в свободном состоянии составляла 0,32 мкг/кг массы кролика, а в липосомальной форме удавалось вводить 8,1 мкг/кг массы кролика без проявления пирогенной реакции. Авторы провели изучение иммуногенности липосомального малярийного плазмодия на обезьянах, где в качестве адъюванта использовали непирогенный липосомальный липид А.

Вакцины, содержащие пептиды различной структуры

Адьювантной активностью обладают микобактериальные пептидогликаны, в частности, мурамилдипептид, его аналоги и стереоизомеры. По многим свойствам *мурамилдипептид в липосомах* позволяет значительно повысить иммунный ответ и снизить его негативные свойства. Рядом авторов предложено использовать мурамилдипептиды и его производные ВЗО-МДР, 18-МДР, С12-МДР, представляющие собой конъюгат мурамилдипептида с жирными кислотами для повышения антигенной активности ряда антигенов при иммунизации животных. Показано, что введение 18-МДР достаточно эффективно для создания защитного иммунитета у обезьян против малярийного плазмодиа. Для исследования роли макрофагов в индукции образования антител на антигены стафилококка применялись липосомы, содержащие С12-МДР. Мыши, получавшие липосомы С12-МДР, за два дня до инъекции α -токсина золотистого стафилококка демонстрировали увеличение образования антистафилококкового анти- α -токсина Ig (иммуноглобулины М и антиколлагенсвязывающий белок Ig G). Установлено, что производные мурамилдипептида или комплекс мурамилтрипептида с фосфатидилэтаноламином являются эффективными агентами для активации макрофагов, направленных против опухолевых клеток или клеток вирусов. *Липосомальный комплекс мурамилтрипептид – фосфатидилэтаноламин* (МТР – ФЭА), предназначенный для внутривенного введения, находится на I фазе изучения. Необходимо отметить, что в отличие от липосомального липида А, липосомальный МТР – ФЭА токсичен и пирогенен, что задерживает его применение в качестве адъюванта для вакцин в медицине.

Обезьян иммунизировали против человеческого малярийного паразита *Plasmodium Falciparum*. Две инъекции антигеном, включенным в липосомы совместно с 6-0-стероил-N-ацетилмурамил-D-аланил-D-изоглютамин, защищали всех животных при заражении летальной дозой возбудителя.

Была оценена иммуногенность *липосомальной вакцины с антигенными пептидами*, полученными из гликопротеина вируса лимфоцитарного хориоменингита. Инкапсулированные в липосомы пептиды обладали высокой иммуногенностью при внутрикожном введении и вызывали защитный противовирусный иммунитет. После внутрикожной инъекции липосомы образовывали «депо» антигена, которая облегчала длительную загрузку антигена дендритными клетками практически только в местные лимфоузлы. Иммуногенность липосомальной пептидной вакцины еще более повышалась при введении в липосомы иммуностимулирующих олигонуклеотидов, что приводило к значительному активированию дендритных клеток. Предложенная липосомальная пептидная вакцина вызывала защитный противоопухолевый иммунитет. Учитывая, что реакции противоопухолевых и противовирусных Т-клеток вызываются в основном дендритными клетками, транспортирующими антиген с периферии в организованные лимфоидные ткани, можно предположить, что активирование дендритов липосомальными пептидными вакцинами свидетельствует об их высокой иммуногенности и возможности создания защитной противовирусной или противоопухолевой иммунной реакции.

Бесспорно, перспективным является использование *липосомальных вакцин, содержащих патогенные пептиды*, с помощью которых можно предотвратить аутоиммунные заболевания без неспецифического подавления реакций Т-клеток, как это было показано при подкожном введении мышам липосом, содержащих пептид К-2, который соответствует остаткам 201–216 бычьего интерфероторецептора ритеноидсвязывающего белка.

Интерес представляет *липосомальная вакцина, содержащая пептид, выделенный из пилей Pseudomonas aeruginosa, как В-эпитоп*. В липосомы также включали очищенный гемагглютинин из вируса гриппа, как Th-эпитоп,

а также адъювант. Получен иммунный ответ в виде выработки специфических антител, способных защитить от инфекции, вызванной *P. aeruginosa*.

Липосомы как иммунологические адъюванты были использованы для получения антител, специфических к полипептиду. Липосомы были приготовлены из смеси фосфатидилхолина, холестерина, доцетилфосфата и α -токоферола в молярных соотношениях 4 : 3 : 0,1 : 0,5 и имели отрицательный заряд. В липосомы помещали отрицательно заряженный полипептид, который вследствие заряда не комплексовался с липосомой и находился внутри липидной структуры. Наилучшие результаты получены при внутривенной или внутрибрюшинной иммунизации.

Вакцины, содержащие бактериальные полисахариды

Предложены методы получения *липосомальных вакцин для профилактики столбнячной, гемофильной, менингококковой, стрептококковой инфекции.*

Липосомы получали из яичного фосфатидилхолина со степенью чистоты 90 % или соевого гидрированного фосфатидилхолина со степенью чистоты 98 %. Оптимальный размер липосом 80–300 нм. В качестве полисахарида использовали *капсульный полисахарид Haemophilus influenzae*. Структура капсульного полисахарида, играющего важную роль в вирулентности бактерий *Haemophilus influenzae*, установлена как 3-В-D-рибофунарозил-(1-1)-D-рибитол-5-фосфат. Авторами были получены липосомы, содержащие капсульный полисахарид и белковые антигены ряда бактерий. В табл. 10 мы приводим общепринятые количества полисахарида и белковых компонентов (дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, белок менингококка), используемые для производства коммерческих вакцин. Полученные авторами липосомальные вакцины при подкожном введении мышам продемонстрировали высокий уровень специфических защитных антител.

Таблица 10 – Состав вакцин с использованием капсульного полисахарида *Haemophilus influenzae*

Название вакцины	Количество полисахарида в 1 дозе, мкг	Название протеина	Количество протеина в 1 дозе, мкг	Соотношение полисахарид – протеин
PRP-D	25	Дифтерийный анатоксин	18	1,38
НьОС	10	Дифтерийный анатоксин	25	0,4
PRP-T	10	Анатоксин столбнячный	20–30	0,33–0,5
PRP-OMP	7,5	Neisseria meningitidis	125	0,06

4.3. Рибосомальные вакцины

Рибосомы – органеллы, продуцирующие белок по матрице иРНК. Выделенные рибосомы с матрицей в чистом виде и представляют собой рибосомальную вакцину.

Рибосомальные вакцины представляют собой рибосомальную фракцию, выделенную из микроорганизмов и обладающую иммуногенными свойствами: способностью индуцировать синтез антител и защищать человека и животных от заражения соответствующими микроорганизмами. Протективная активность рибосомальных вакцин может быть связана с адсорбированными на рибосомах молекулами бактериальных антигенов. В связи с этим введение рибосомальных антигенов в липосомы позволяет повысить эффективность вакцины. Известно, что рибосомальные вакцины эффективны в иммунопрофилактике ряда инфекционных заболеваний. Изучена способность рибосом, выделенных из штамма *S. Sobrinus 6715* и включенных в липосомы на основе фосфолипидов и холестерина, индуцировать синтез специфических антител Ig A в слюне крыс. Показано, что уровень Ig A против рибосом и цельных клеток *S. Sobrinus 6715* был у иммунизированных крыс значительно выше, чем у контрольных животных. Была также резко понижена колониза-

ция *S. Sobrinus 6715* в полости рта. Авторы предложили использовать липосомальные рибосомальные вакцины для защиты от кариеса. Так, например, при введении 12,5 мкг липосомальной вакцины обнаружены значительные защитные титры антител, а введение чистой вакцины без липосом в дозе 250 мкг не выявляло иммуногенности.

Предложена вакцина, в которой в качестве антигена использованы рибосомы *Candida albicans*. Липосомы получали из димиристоилфосфатидилхолина и димиристоилфосфатидилглицерина в молярном соотношении 9 : 1. В качестве адъюванта использовали липид А. Проведено изучение липосомальной вакцины, содержащей рибосомы при сравнении с вакциной с адъювантом Фрейнда (один из наиболее распространенных адъювантов, содержит убитые туберкулезные микобактерии, суспензированные в масляной фазе водной эмульсии) на мышах. Уровень иммунного ответа был более высоким. Авторы предложили использовать полученную вакцину для иммунизации людей.

Вакцины, содержащие компоненты бактериальной клетки

С целью повышения иммуногенности, вводимых через слизистую антигенов, авторы включали геммагглютинин (ГА) *Bordetella pertussis* в липосомы, содержащие в качестве модельного антигена глутамин-*S*-трансферазу (ГТ) *Schistosoma mansoni*. Неинбредных мышей дважды интраназально иммунизировали липосомальным препаратом, содержащим постоянную дозу ГТ и возрастающие дозы ГА. Добавление 3 мкг ГА к липосомам вызывало более чем 10-кратное повышение титра антител к ГТ. Присутствие ГА не изменяло гуморального ответа у животных, а их сыворотки содержали иммуноглобулин G (Ig G1, Ig G2a и Ig G2b). Однако только при наличии ГА в указанной дозе наблюдалось появление антител к ГТ класса Ig GA. Эти результаты показывают, что ГА обладает потенциалом повышения иммуногенности антигенов, введенных в липосомы.

Основной белок наружной оболочки гонококка, протейн I, был включен в липосомы, состоящие либо из дипальмитоилфосфатидилхолина и олеилфосфатидилхолина в соотношении 1 : 1; либо из дипальмитоилфосфатидилхолина и олеилфосфатидилэтаноламина в соотношении 1 : 1. Авторами обнаружено, что практически весь белок был включен в липидный бислой,

причем, существенных различий в степени включения в зависимости от липидного состава не обнаружено, причем около 80 % белка было ориентировано наружу, что напоминало структуру бактериальной мембраны гонококка. Средний диаметр везикул составлял около 0,5 мкм, но за счет дополнительной экструзии мог быть заметно уменьшен без потери включения в бислой белка. Проведенное изучение связывания липосом как с моноклональными антителами против данного белка, так и с антителами, полученными путем иммунизации кроликов, продемонстрировали достаточно близкие результаты. Состав липосом также не определял способности к связыванию. Исследовалось иммунозащитное действие белка, выделенного из фильтрата культуры с молекулярной массой 30 кД. В качестве адъюванта были использованы фосфатидилхолиновые липосомы, подвергшиеся лиофилизации. Иммунизация животных приводила как к клеточным (пролиферация Т-клеток и секреция цитокина), так и к гуморальным реакциям. Учитывали выживаемость и количество живых микобактерий в органах: селезенке, печени, легких. Результаты авторов убедительно показывают, что липосомы являются идеальной системой доставки вакцины, которая может нести на себе секреторный белок микобактерий туберкулеза. Липосомы готовили из смеси фосфолипидов, холестерина, доцитилфосфата в молярных отношениях 2 : 1,5 : 0,22. Фосфолипиды в большинстве случаев были представлены 1,2-димиристоил-*sn*-фосфо-3-*o*-холином. В липосомы включали липид А. Иммунизация кроликов указанным комплексом приводила к более высокому титру антител против липида А, чем при иммунизации чистым липидом А.

Очищенный антиген *Fi Yersinia pestis*, прикрепленный к поверхности липосом при внутрибрюшинном введении мышам, стимулировал высокие титры антител в сыворотке, а также вызывал защитную реакцию при заражении мышей через слизистую оболочку микробными клетками в дозе 1 : 105 *Y. pestis*. Защитная реакция у животных достигается уже при однократной иммунизации.

Из стимулированных митогенов лимфоцитов крыс получали бесклеточные супернатанты культур, богатые фактором, активирующим макрофаги (ФАМ). Эти супернатанты инкапсулировали в липосомы различного размера и липидного состава, и сравнивали их способность придавать нормальным мышинным макрофагам цитотоксичность для опухолевых клеток с

аналогичной способностью неинкапсулированного ФАМ, добавленного во внеклеточную среду. Нормальные макрофаги мышей C57BL16, C3H/HeN, обработанные ФАМ-липосомой, проявляли значительные цитотоксические свойства *in vitro* против сингенных и аллогенных опухолевых клеток, но не убивали неопухолевые клетки. Показано, что липосомы-ФАМ делают макрофаги токсичными для опухолей в концентрации в 20000 раз меньшей, чем свободный ФАМ.

На возможность использования липосомальных вакцин указывают авторы, изучающие липосомы как потенциальные иммуностимуляторы. Мышей иммунизировали антигеном, выделенным из фильтрата культуры криптококка и эмульгированном в полном адьюванте Фрейнда. Вторую группу животных иммунизировали этим же антигеном, заключенным в фосфатидилхолиновые липосомы. Иммуногенные свойства препаратов оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа и по способности защищать животных от внутривенного введения живой культуры криптококков в количестве 1–105. Подавление развития культуры оценивалось через 7 дней путем подсчета криптококковых колониеобразующих клеток в легких, селезенке, печени и головном мозге инфицированных мышей. Полученные результаты подтвердили защитный эффект липосомальной формы антигена. Однако при иммунизации антигеном, эмульгированном в полном адьюванте Фрейнда, защитный эффект был более выраженным. Несмотря на полученные результаты, авторы оценивают использование липосомальной формы антигена как весьма перспективной при создании липосомальных вакцин.

4.4. Противоопухолевые вакцины

На поверхности многих клеток в организме существует молекула, называемая MUC-1.

MUC-1 – это белок, который выражен на поверхности эпителиальных клеток и является продуктом гиперэкспрессии во многих злокачественных опухолях. Большое количество MUC-1 характерно для многих раковых клеток. Аномалии в MUC-1 зафиксированы при раке молочной железы, раке предстательной железы, раке яичника, поджелудочной железы и колотерального рака. Важно отметить, что исследования показали, что можно провести

различия между MUC-1 антигенами, специфичными для опухолевых клеток и тех, которые связаны с нормальными тканями. Вакцина вводится подкожно в 4 участка тела. *В состав вакцины входит иммуноадъювант монофосфориллипид (3-О-дезацил-4-липофосфорил-липид А) (МФЛ)* неспецифический стимулятор, обеспечивающий более интенсивное взаимодействие вакцины с клетками иммунной системы. Безопасность МФЛ была подтверждена в исследованиях на людях. Так, например, МФЛ как вспомогательное вещество введено в коммерческую вакцину против папилломы – «Церварикс» («Глаксосмит Кляйн», Бельгия). Оба компонента включены в липосому (MUC-1 и МФЛ). Препарат хорошо переносится и при использовании в дозах от 20 до 200 мкг выживаемость больных составляет от 5,4 до 14,6 месяцев.

Следует отметить, что у 94 % больных раком простаты – слизееобразующий MUC-1 – гликопротеин, который связан со злокачественной трансформацией и устойчивостью к цитотоксическим агентам. Он индуцирует клеточный иммунный ответ, который может обеспечить опосредованное иммунное убийство опухоли. Вакцина при раке простаты продемонстрировала безвредность и эффективность.

Несколько раковых клеток, включая клетки рака легкого, содержат увеличенное количество пептида MUC-1 (эти клетки – мишень для попадания).

Начат 3-й этап клинического изучения немелкоклеточного рака легких (НМРЛ). Немелкоклеточный рак легкого составляет примерно 75 % всех раковых заболеваний легких. *Новая вакцина против НМРЛ – L-BLP-25 (StimuVax)*. Доклиническое изучение показало, что вакцина L-BLP-25 генерирует мощные типы цитотоксических Т-хелперов 1 (Th1) по борьбе с MUC-1, обладает противоопухолевой активностью как *in vivo*, так и *in vitro*. Клинические исследования показали, что вакцина улучшает медиану выживаемости больных НМРЛ и обеспечивает клинически значимые улучшения в профиле опухоли и качество жизни больных, иммунизированных вакциной. Клинические испытания вакцины L-BLP-25 проводятся Merck Serono Oncology (фаза II / III).

Клинические испытания *BLP-25 вакцины* проведено на 171 пациенте в возрасте от 17 до 41 года с немелкоклеточным раком легкого. Установлено отсутствие токсического действия препарата. Более 54 % больных были жи-

вы более 24 месяцев. Обнаружены клинические преимущества липосомальной вакцины. Побочные эффекты от BLP-25 – покраснение, болезненность в области инъекции, кашель, усталость, одышка.

Для иммунизации мышей использовали клетки мышинной аденокарциномы GZH1, в которые был трансформирован человеческий антиген MUC-1, заключенный в липосомы. Такая иммунизация обеспечивает полную защиту животных, как при подкожной, так и при внутривенной иммунизации опухолевыми клетками.

Вакцины, содержащие компоненты сыворотки крови

Мультиламеллярные липосомы из фосфатидилхолина покрывали антигенами (человеческим сывороточным альбумином или бычьим гаммаглобулином) простым суспендированием липосом в растворе антигена. Покрытые антигеном липосомы характеризовались той же адьювантной активностью после внутривенного введения, что и липосомы, содержащие кроме фосфатидилхолина также и фосфатидную кислоту. Липосомы из фосфатидилхолина характеризуются безвредностью, биodeградируемые, не обладают собственной иммуногенной активностью и могут быть введены внутривенно, что позволяет рассматривать их как иммуноадьюванты. Так, внутривенное введение кроликам 0,5 мг сывороточного альбумина человека не вызывает появления антител, а 0,01 мг указанного антигена, заключенного в липосомы, приводит к иммунному ответу.

Иммуногенность гаптенированных липосом зависела от количества включенных в них конъюгатагаптанов. Она возрастала после обработки гаптенированных липосом ультразвуком. Причем, внутривенная иммунизация была более эффективна, чем подкожная или внутрибрюшинная. При изучении липосом, нагруженных белковым антигеном *Neisseria gonorrhoeal*, обнаружено, что содержание белка в липосомах не является определяющим фактором в иммуногенности. Изменение строения липосомальной мембраны отражалось только на первичном иммунном ответе, а иммунологическая память при этом не изменялась.

С целью изучения возможности применения липосомальных вакцин для пероральной иммунизации готовили *липосомы из фосфатидилхолина,*

содержащие в качестве антигена бычий сывороточный альбумин. Липосомы были покрыты выделенным из дрожжеподобного грибка полисахаридом. Последний был представлен в 2-х формах: природной и модифицированной в пальмитиновое производное. Иммуностимулирующее действие изучали путем определения содержания иммуноглобулинов А и G в сыворотке животных после перорального введения липосом. Использование липосомального препарата приводило к более высоким титрам антиальбуминовых иммуноглобулинов по сравнению со свободным альбумином, причем модифицированный полисахарид приводил к значительно более высоким титрам, чем иммунизация природным соединением. Полученные результаты дают основания предположить, что липосомы, покрытые химически модифицированным полисахаридом, могут быть использованы в качестве потенциальных адьювантов для эффективной пероральной иммунизации.

При иммунизации мышей внутривенно 2–7 раз липосомами, состоящими из холестерина и фосфатидилхолина и липосомами, состоящими только из фосфатидилхолина, в которые заключен антиген-бычья В-глококоннидаза, обнаружены антитела, специфические в отношении указанного антигена. Авторы продемонстрировали способность таких липосом стимулировать антителообразование и активизировать фагоциты. Изучение стабильности липосом, содержащих фермент, показало, что максимальной стабильностью обладают препараты, содержащие фосфатидилхолин, холестерин, фосфатидную кислоту в соотношении 7 : 5 : 1. Изменение жирно-кислотного состава липосом слабо сказывалось на их стабильности. В то же время, при еженедельном подкожном введении РНК-азы с липосомами, состоящими из фосфатидилхолина и холестерина в молярном соотношении 7 : 2, антитела к РНК-азе появлялись после четвертой недели и достигали пика после 5-ой инъекции на 63 сутки, антитела к щелочной фосфатазе и человеческому сывороточному альбумину появлялись после второй недели и достигали пика после 3-ей инъекции на 33 сутки. У контрольных животных, иммунизированных по той же схеме и теми же антигенами, но с полным адьювантом Фрейнда, антитела ко всем антигенам появлялись раньше на 1–2 недели и достигали более высоких титров.

Исследовали влияние липосом на возникновение иммунологической памяти на антиген. Для этой цели кроликам вводили липосомы, содержащие в качестве антигена сывороточный альбумин человека, пероксидазу хрена, липополисахариды. Установили, что при первичном и вторичном иммунном ответе на альбумин липосомы оказывают адьювантное действие. Если вводимые дозы липосом с альбумином были столь малыми, что не вызывали иммунологического ответа, то не возникала и иммунологическая память на альбумин. Введение липосом, содержащих пероксидазу, не вызывало первичного иммунного ответа, но приводило к появлению иммунологической памяти на фермент. Описано изучение многослойных липосом, приготовленных из фосфатидилхолина и холестерина в молярных соотношениях 7 : 2 в качестве иммунологических адьювантов при иммунизации кроликов лизоцимом. Продемонстрирована возможность получения высоко титровых сывороток против лизоцима, активность которых превышала титры, полученные при использовании индивидуального лизоцима или лизоцима, связанного с адьювантом Фрейнда. На интенсивность иммунного ответа влияет способ введения липидных препаратов, липидный состав и поверхностный заряд липосомальной мембраны.

Известно, что липид-белковые комплексы обладают большей иммуногенностью, чем индивидуальные липиды. Естественно предположить, что при включении белка в липосомы могут формироваться белково-липидные комплексы, которые в свою очередь будут усиливать иммунный ответ. Однако рядом авторов изучен гуморальный иммунный ответ у крыс после введения комплекса фосфатидилхолин – человеческий сывороточный альбумин. Установлено, что показатели титров антител практически не увеличиваются при иммунизации указанными комплексами по сравнению с водным раствором антигена.

Итак, липосомальные адьюванты можно успешно использовать для получения сывороток против различных антигенов: ферментов, токсинов, белков крови, вирусов, бактерий и других соединений.

Вакцины, содержащие антигены риккетсий

Липосомы получали с использованием метода механического диспергирования из фосфолипидных антигенов *R. prowazekii*. В состав липосом вводили химическую сыпнотифозную вакцину. Иммунобиологические свойства фосфолипидных антигенов изучали в составе риккетсиозных липосомальных препаратов как в реакциях *in vitro*, так и путем подкожной иммунизации кроликов, морских свинок и мышей 50 мкг фосфолипидных антигенов с удельной активностью 2 ЕС/мкг и 48 ЕС химической сыпнотифозной вакцины в 0,5 мл. Установлено, что липосомальные препараты не обладают гематотоксичностью и не оказывают токсического действия в опытах на животных. Выявлено потенцирующее действие фосфолипидных антигенов в составе липосомальных препаратов на иммуногенность химической вакцины. Показаны адьювантные свойства риккетсиальных фосфолипидов в составе липосом на основе химической сыпнотифозной вакцины.

Отмечено адьювантное действие липосом *при введении чумной живой вакцины*, существенно повышающее напряженность иммунитета у лабораторных животных. Но при этом липосомы не влияли на уровень титров специфических антител. По-видимому, усиление иммунизирующего эффекта живой чумной вакцины связано с неспецифическим клеточным влиянием липосом на элементы РЭС и более интенсивным включением их в процесс иммуногенеза.

Ключевыми аспектами, влияющими на разработку новых эффективных адьювантов и вакцин, предназначенных для человека, являются безопасность, высокая степень очистки и физико-химические характеристики окончательного состава адьювантов. Липосомы проявляют свою безопасность в клинических условиях при использовании их как адьювантов вакцин для вирусных и бактериальных антигенов. Были подтверждены в клинических условиях тесты контроля качества, установившие высокую степень очистки, безопасность и стабильность липосомальных вакцин. Липосомы можно рассматривать как основных кандидатов для улучшения иммуногенности как антигенов с гидрофобными участками, так и растворимых не мембранных

протеинов. Расположение антигена (т.е. абсорбирован ли он, или присоединен к липосомальной поверхности при помощи ковалентных связей, или инкапсулирован во внутренний объем липосомы) имеет важное значение и определяет в значительной степени иммунобиологические свойства вакцин.

Таким образом, накопленные в литературе данные свидетельствуют о высоком адъювантном действии липосом. Отрицательно заряженные липосомы стимулируют более высокие показатели титров антител, чем положительные. Показатели титров при вторичной иммунизации были на три порядка выше, чем при первичном введении антигенов. Отмечено также снижение иммунологического ответа на антиген в липосомах, содержащих более 30 % холестерина и приготовленных из фосфолипидов с высокой температурой фазового перехода. На интенсивность иммунного ответа влияет также способ введения липосомальных препаратов. Наиболее высокие титры антител выявляются при подкожном введении.

Необходимо отметить, что ряд липидных соединений обладает собственной иммуногенностью, вследствие чего для адъювантов целесообразно использовать липиды, лишенные иммуногенных свойств. Например, фосфатидилхолиновые адъюванты являются перспективными при поверхностном экспонировании различных антигенов, так как не обладают собственной иммунологической активностью. Важным условием для создания липидных адъювантов является наличие высокоочищенных и минимально окисленных липидов. Поэтому фосфатидилхолин является очень удобным объектом для исследования адъювантной активности липидов, так как для его изготовления разработаны промышленные технологии, дающие возможность получать целевой продукт высокого качества в больших количествах и сравнительно недорого, что крайне важно для практического использования фосфатидилхолиновых адъювантов для массовой иммунизации.

В отличие от других адъювантов, в месте инъекции образования гранул не происходило. Еще одно преимущество применения липосом как иммунологических адъювантов состоит в том, что если антиген заключен внутрь липосом, то можно избежать реакций гиперчувствительности.

В случае использования липосомальных вакцин иммунный ответ усиливается вследствие того, что антигены, ассоциированные с липосомами, попадают непосредственно в антиген представляющей клетки. В липосомы включают кроме антигена (вирусный капсид) еще белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток, например, для липосомальной вакцины против гепатита А – гемагглютинин вируса гриппа. Для таких препаратов используют термин «*виросомы*». «Виросомы» повторяют естественный путь вирусной частицы, в результате чего на поверхности антигена представляющей клетки оказывается экспонированный фрагмент антигена в виде узнаваемом Т-хелперами.

В настоящее время проводится испытание нескольких липосомальных вакцин против шигел и патогенной *E. coli*. Ведутся разработки липосомальных вакцин против гриппа, дифтерии, столбняка, гепатита А и В.

В заключение хотелось бы отметить, что *преимуществом липосомальных адъювантов и липосомальных вакцин* является следующее:

- ✓ антигены с низкой иммуногенностью могут быть превращены в высокоэффективные антигены;
- ✓ в липосомы можно включать гидрофобные антигены;
- ✓ адъюванты и антигены могут одновременно быть включены в структуру липосомы;
- ✓ липосомальные вакцины позволяют получать высокие титры специфических антител;
- ✓ с помощью липосомальных вакцин можно достигнуть длительного продолжения специфического действия антител;
- ✓ использование липосом позволяет уменьшить токсические и пирогенные свойства антигенов и адъювантов.

Липосомальные препараты нашли применение для вакцинации человека и животных. Использование липидов в качестве адъювантов позволяет при введении меньшего количества лекарственных средств (антигенов) получать значительный иммунный ответ. Вероятно, такие свойства липидных адъювантов, как безвредность и биodeградируемость делают их весьма перспективными.

Контрольные вопросы

1. Объяснить какими преимуществами обладают липосомы в составе вакцинных препаратов.
2. Какую роль играют адьюванты в иммунологии, и какие свойства липосом определяют их адьювантность?
3. Указать какие рекомбинантные продукты используются в составе липосомальных вакцин. Преимущества липосомальных рекомбинантных вакцин.
4. Указать что общего у вирусной частицы и липосомы. Привести примеры липосомальных вирусных вакцин, описать структуру и свойства.
5. Приведите характеристику рибосомальных вакцин и их липосомальных форм.
6. Привести примеры бактериальных белковых липосомальных вакцин, описать структуру и свойства.
7. На примере липосом, содержащих антиген MUC-I описать преимущества липосомальных противоопухолевых вакцин.
8. Опишите механизм обеспечивающий сохранность антигенного материала в составе липосомальной вакцины.
9. Опишите основные физико-химические и фармакологические методы контроля липосомальных вакцин.
10. Привести примеры бактериальных полисахаридных липосомальных вакцин, описать структуру и свойства.
11. Какими преимуществами обладают липосомальные вакцины по сравнению с вакцинами классического состава?
12. Докажите преимущества липосом в качестве адьювантов по сравнению с минеральными и масляными усилителями иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перспективы использования липосомальных форм лекарственных препаратов

Приведенные в данном учебном пособии данные подтверждают возможность широкого использования липосомальных форм лекарственных препаратов для лечения различных заболеваний. За прошедшие годы лекарственные липосомальные препараты успешно используются в онкологии, офтальмологии, кардиологии, лечении и профилактике (вакцинология) инфекционных заболеваний и т.д. Сегодня десятки миллионов пациентов лечатся с использованием коммерческих липосомальных форм препаратов: «Доксил», «Амбизом», «Липин», «Визудин», «Лиолив», «Липофлавон», липосомальные противовирусные вакцины. Эти препараты и ряд других выпускаются фармацевтической промышленностью различных стран.

Принципиальная возможность использования липосом прежде всего основана на функциях биологических мембран. В ряде случаев патологические изменения в организме затрагивают преимущественно липидные компоненты мембраны, что дает возможность восстановления нарушенной мембраны путем введения в организм фосфолипидных липосом. Наглядным примером является использование первого в мире коммерческого препарата «Липин» для восстановления поврежденных мембран у пациентов с рядом заболеваний (пульмонология, нефрология, гинекология, кардиология). Аналогично установлено восстанавливающее действие липосом из фосфатидилхолина на мозговую ткань человека с болезнью Альцгеймера. Обосновано применение липосом в тех случаях, когда на лицо патология, приводящая к снижению уровня фосфолипидов, например, фосфатидилхолина в мембранах. Так, например, в условиях геморрагического шока, наблюдается повреждение клеточных мембран, определяющее, зачастую, прогрессивное падение содержания фосфатидилхолина в мембранах. При применении фосфатидилхолиновых липосом уже через 30 минут от начала кровопотери в митохондриях продолговатого мозга у животных, подвергнутых геморрагическому шоку, содержание фосфатидилхолина оказалось повышенным в 2,5 раза по сравнению с не лечеными животными. Одновременно показано восстановление уровня фосфолипидов в митохондриях лобных долей больших по-

лушарий головного мозга и в гепатоцитах, в то же время липосомы стабилизировали артериальное давление на субнормальном уровне в течение длительного времени. Авторы, сравнивая липосомы из фосфатидилхолина яичного желтка с известными препаратами для лечения геморрагического шока (супероксиддисмутаза, бупреморфин, буторфанол и др.) приходят к выводу, что липосомальная форма превосходит их по эффективности.

Имеются сообщения о возможности проведения детоксикации с помощью липосом, что подтверждает их транспортную функцию. Так, липосомы из фосфатидилхолина яичного желтка были применены в качестве токсикотропного средства при отравлении CCl_4 . После внутривенного введения липосом отмечена меньшая степень снижения активности ферментов, в частности, сукцинатдегидрогеназы и аденозинтрифосфатазы. Лечение липосомами, содержащими клодронат, больных с ревматоидным артритом при внутрисуставном введении, приводит к уменьшению количества макрофагов и адгезионных молекул в синовиальной оболочке. Необходимо отметить, что введение препаратов в липосомальной форме, может позволить проводить лекарственные средства через гематоэнцефалический барьер, как это показано для препарата ДОФА, инкапсулированного в липосомы из фосфатидилхолина и используемого для лечения болезни Паркинсона. Причем, удается снизить один из симптомов синдрома Паркинсона (ригидность) при использовании доз в 10 раз меньше, чем при использовании препарата ДОФА в свободной форме, что может быть связано с защитой лекарственного средства от ферментов.

О перспективности разработки липосомальных препаратов может свидетельствовать ежегодное увеличение работ посвященных исследованию липосом, направленных на создание новых лекарственных препаратов, проведение их доклинического и клинического изучения.

Проводятся клинические испытания препарата «Нанокорт» (липосомальная форма преднизолона) для лечения ревматоидного артрита и рассеянного склероза.

Так, И. Беренхольц, исследователь и разработчик высокоэффективного противоопухолевого препарата «Доксил» предложил использовать липосомальный лекарственный препарат для лечения остеоартрита. При этом заболевании происходит воспаление синовиальной жидкости, уменьшающей трение при работе суставов. Воспаление приводит к разрушению хряща, что в

свою очередь сопровождается непосредственным соприкосновением костей. Последнее вызывает сильные боли и нарушение подвижности суставов. Автором для снятия воспалительных процессов предложено внутрисуставно вводить фосфатидилхолиновые липосомы и гиалуроновую кислоту.

Приведенные в данной работе данные позволяют надеяться на реальную возможность использования липосомальных форм цитостатиков для лечения злокачественных опухолей различной локализации. Специалисты многих стран мира работают над созданием готовых лекарственных форм цитостатиков, инкапсулированных в липосомы. Применение цитостатиков, инкапсулированных в липосомы, значительно расширяет возможности химиотерапии опухолей и повышает ее эффективность.

Снижение токсичности препаратов, в частности, гематотоксичности и кардиотоксичности антибиотиков антрациклинового ряда, позволит значительно уменьшить нежелательное действие химиотерапии. Кардиотоксичность этих препаратов – один из основных факторов, ограничивающих их применение в клинике. Поскольку частота проявления кардиотоксического действия зависит от дозы и резко повышается при высоких кумулятивных дозах, противоопухолевую активность антрациклиновых антибиотиков нельзя использовать полностью. В связи с этим включение антибиотиков в липосомы позволяет не только использовать их в полном объеме, но и повысить дозу препарата. Последнее возможно в связи с измененной фармакокинетикой препарата, его меньшим накоплением в сердечной мышце. Кроме того, фосфатидилхолиновые липосомы, вероятно, могут снижать процессы перекисного окисления липидов и уменьшать их непосредственное влияние на митохондрии и ядро миокардиоцитов.

Использование липосомальных форм цитостатиков в клинике продемонстрировало снижение побочного действия препаратов, что проявляется в уменьшении нефро- и кардиотоксичности, уменьшении случаев рвоты, тошноты, аллопеции, периферических нейропатий, снижении угнетения иммунной системы.

Фармакокинетика инкапсулированных в липосомы лекарств, в частности, цитостатиков определяется взаимодействием двух факторов: скоростью выведения из плазмы (клиренсом) липосомального препарата и стабильностью соединения липосомы с лекарством в кровяном русле. Данный процесс зависит от свойств препарата и липосомального носителя, а именно: от раз-

мера липосом и их физико-химических свойств, проницаемости отдельных тканей, природой связи между липосомой и лекарственным веществом. Использование в последнее время полиэтиленгликоля (ПЭГ) для покрытия липосом делает их более защищенными от ретикулоэндотелиальной системы, что в свою очередь приводит к увеличению продолжительности полупериода существования препарата в кровяном русле и медленным проникновением в опухолевую ткань. ПЭГ-покрытие также тормозит белково-опосредованное связывание с клетками. По-видимому, очевидным является использование для введения цитостатиков липосом малой величины, что позволяет уменьшить захват препаратов ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС) и увеличить время их циркуляции в кровяном русле.

Хотелось также остановиться еще на одном вопросе. Почему липосомальные формы цитостатиков и других лекарственных препаратов избирательно накапливаются в опухолевой ткани? Физиология солидных опухолей отличается от физиологии нормальных тканей целым рядом существенных аспектов, причиной большинства которых являются различия в васкуляризации (формирование новых кровеносных сосудов – обычно капилляров). В отличие от регулярной, упорядоченной васкуляризации нормальных тканей, сосуды опухолей часто представляют собой аномальные, деформированные капилляры с проницаемыми стенками и замедленным кровотоком. Рост опухоли требует и непрерывного роста новых сосудов, т.е. ангиогенеза. Эти различия в физиологии могут создать проблемы при лечении рака: например, гипоксия в солидных опухолях вызывает резистентность к лучевой терапии и к некоторым противоопухолевым препаратам. Однако эти различия могут быть использованы для селективного лечения рака, а именно: проницаемые кровеносные сосуды опухоли могут быть использованы для применения липосом различного состава, в том числе и стерически стабилизированных. Как известно, в большинстве нормальных тканей проникновение частиц ограничивается непрерывной эндотелиальной выстилкой сосудов. Крупные частицы и липосомы диаметром более 250 нм практически не проникают сквозь капилляры даже в случаях, где межклеточные контакты и поры в эндотелии достаточно велики. Плотные межклеточные контакты (2–6 нм) между эндотелиальными клетками и большинством нормальных тканей препятствуют экстравазации даже очень мелких липосомальных частиц (до 30 нм в диаметре). Ткани, богатые синусоидами и капиллярами (печень, селезенка, костный

мозг) или патологические ткани с поврежденными или измененными капиллярами, обладают повышенной порозностью и проницаемы для частиц диаметром менее 100 нм. Многие первичные и метастатические опухоли имеют прерывистую и высокопроницаемую систему сосудов, достаточную для выхода мелких частиц, включая и липосомальные. Таким образом, физиология сосудов определяет повышенный уровень поглощения в печени, селезенке и опухолевых тканях. Именно этот факт и может приблизить нас к пониманию избирательного накопления в опухоли цитостатиков, введенных в липосомах. Как оказалось, локализация липосом в опухоли является результатом повышенной степени проникновения через проницаемые капилляры опухолей в сочетании с нарушением лимфатического дренажа. Специфическая структура кровеносных сосудов в опухоли и небольшой размер липосом приводит к устойчивому накоплению липосомального лекарственного вещества в опухоли, обеспечивая этим пассивную направленную доставку и повышение терапевтической эффективности препаратов. Как показали морфологические исследования солидных и асцитных опухолей, присутствие ПЭГ-липосом ограничивается в основном внеклеточной жидкостью опухоли и они постепенно высвобождают нагруженное лекарственное вещество в микросреду опухоли. При изучении действия липосомальных форм препаратов и их фармакокинетики необходимо учитывать, что при измерении объема опухолевых сосудов в опухолях разных размеров была обнаружена обратная корреляция между массой опухоли и объемом опухолевых сосудов. Последнее было показано при использовании меченных ПЭГ-липосом на модели рака головы и шеи человека у безволосых мышей. Использовали опухоли с размером 0,1 г и 1 г. Полученные авторами данные имеют важное значение для стратегии целенаправленного клинического применения липосом при солидных опухолях.

Таким образом, важным фактором, обеспечивающим высокую эффективность липосом, является избирательность накопления липосом, а, следовательно, и лекарственного средства в патологической ткани. Последнее, прежде всего, «адресная» доставка липосом связана с неполноценностью патологически измененных кровеносных сосудов, например, в злокачественной опухоли или при ревматоидном артрите. Быстро растущие, под влиянием синтезируемых факторов «неоангиогенеза», стенки кровеносных сосудов приобретают избыточную проницаемость. Исследования подтвердили, что размеры промежутков между клетками эндотелиальной выстилки в таких пато-

логических кровеносных сосудах большинства периферийных опухолей варьируется от 200 до 600 нм, что уже само по себе достаточно для объяснения увеличенной проницаемости липосом, которая возникает за счет образования в поврежденной ткани значительных промежутков, щелей и других источников, позволяющих липосомам беспрепятственно проникать в патологические ткани. Липосомальные наночастицы, являющиеся носителем лекарственного средства, могут накапливаться в некоторых участках организма, например, в солидных опухолях и зоне повреждения ткани при инфаркте миокарда. Этот эффект получил название «эффект увеличенной проницаемости». За счет этого лекарственное средство, например, антрациклиновый антибиотик доксорубин (препараты «Доксил», «Миоцет», «Липодокс») накапливается в опухоли за счет неполноценности стенки её сосудов, и проявляет направленное цитостатическое действие.

Несомненно, перспективным является использование липосомальных препаратов при фотодинамической терапии. Липосомальные производные бензопорфирина (вертепорфирин) являются светочувствительными красителями, проявляющими цитотоксичность за счет образования радикалов кислорода при активации (длина волны 689 нм). В составе липосом вертепорфирин ориентирован на клетки опухолевого сосуда и неоваскулярные эндотелиальные клетки. Вертепорфирин приводит к образованию цитотоксинов только при активации светом в присутствии кислорода. В результате образуется нестойкий с коротким периодом жизни синглетный кислород с высокой реакционной способностью. Синглетный кислород приводит к разрушению биологических структур, что в свою очередь способствует локальной окклюзии сосудов, разрушению клеток и их гибели. Селективность фотодинамической терапии при использовании липосомального вертепорфирина основана не только на локализованном влиянии света, но также и на селективном быстром захвате и удерживании вертепорфирина быстро пролиферирующими клетками, включая эндотелий хороидальной зоны неоваскуляризации. Образованием синглетного кислорода, естественно, во всех подобных случаях дело отнюдь не заканчивается. Это очевидно сопровождается комплексом других изменений состава и активности большой группы участников превращения активного кислорода в тканях, в том числе, в окислительных и антиокислительных ферментах (оксигеназ, дисмутаз и др.). Конечный итог таких реакций суммировать достаточно сложно, но сам факт возможности их направ-

ленного цитостатического или цитолитического эффекта можно считать установленным (препарат «Визудин»).

Известные сегодня препараты цитостатиков являются наиболее эффективными для лечения различных видов опухолей и онкогематологических заболеваний. Однако возможности их применения ограничены проявлением токсичности. Липосомальные формы цитостатиков разрабатываются с целью уменьшения токсичности, а также возможности накопления цитостатиков в опухолевой ткани, что в свою очередь приводит к повышению эффективности лечения. Кроме того, необходимо учитывать, что липосомальная форма препарата защищает его от разрушения ферментами сыворотки крови. Липосомальные формы цитостатиков могут помочь преодолению лекарственной резистентности за счет более длительной циркуляции в крови и избирательному накоплению в ткани опухоли. Сегодня в ряде стран проводится 2–3 фаза клинического изучения липосомальных препаратов, содержащих цитостатики: доцетаксел, паклитаксел, цисплатин, оксалиплатин, камптотецин, винкристин и ряд других. Необходимо отметить, что в настоящее время для иммуноадьювантной химиотерапии используется коммерческий липосомальный препарат «Мераст», содержащий мурамил-трипептид.

Особый интерес исследователей вызывает поиск липосомальных лекарственных препаратов, обеспечивающих «адресную», целевую доставку нужного медикаментозного средства. Такой метод в настоящее время получил специальное название «таргетная терапия», исходя из английского термина «Target» т.е. мишень. Причем, весьма существенно, что такой мишенью могут быть не только сами патологически измененные клетки, вирусы и т.п., но и отдельные элементы клетки, включая находящиеся во внутриклеточной среде. Такими продуктами нанотехнологии являются липосомы, в которые инкапсулированы элементы генетической информации. Действие этих препаратов основывается на взаимодействии лекарств, содержащих нуклеиновую кислоту с генетическим материалом определенных клеток в организме. Крайне важным является вопрос об использовании липосом в генной терапии. Основная задача – это доставка молекулы ДНК. ДНК должна быть «упакована» в таком виде, чтобы она связывалась с клетками-мишенями и, желательно, не связывалась с другими клетками. Успешная доставка длинной нестационарной полианионной молекулы ДНК в клетку-мишень через 3 липидных бислоя, то есть клеточную мембрану и двойную ядерную мембрану, тре-

бует специальных методов. Во-первых, надо создать условия, при которых ДНК не подвергалась бы деградации, механической и энзиматической. Во-вторых, сделать так, чтобы эта ДНК «выживала» перед тем как она попадет в клеточное ядро. Это значит, что когда ДНК попадет в клетку, она должна избежать эндосом и лизосом, а также найти путь к ядру. Одной из возможностей доставки ДНК является образование катионных липидсвязанных комплексов с ДНК в составе липосом. Эти комплексы положительно заряжены, и они связываются с клетками-мишенями. Липосомы способны сливаться с клеточными мембранами и обеспечивать проникновение ДНК в клетки. Аналогичный принцип действия генных вакцин. Применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм пациента вводят молекулы ДНК, содержащие гены, кодирующие иммуногенные белки патогенного микроорганизма.

Нельзя обойти вопрос о роли липосомальных наночастиц в транспортировке и введении в организм гидрофобных соединений. Способность липосомальных мембран «растворять» гидрофобные лекарственные вещества позволяет значительно увеличить их биодоступность и расширить арсенал лекарственных средств, которые до создания таких препаратов невозможно было использовать инъекционно (препараты – «Амбизом», «Липофлакон», «Лиолив»).

Особую роль играют липосомы как адъюванты при создании вакцин. Преимуществом липосомальных адъювантов и липосомальных вакцин является следующее: антигены с низкой иммуногенностью могут быть превращены в высокоэффективные антигены; в липосомы можно включать гидрофобные антигены; адъюванты и антигены могут одновременно быть включены в структуру липосомы; липосомальные вакцины позволяют получать высокие титры специфических антител; с помощью липосомальных вакцин можно достигнуть длительного продолжения специфического действия антител; использование липосом позволяет уменьшить токсические и пирогенные свойства антигенов и адъювантов. Липосомальные препараты нашли применение для вакцинации человека и животных. Использование липидов в качестве адъювантов позволяет при введении меньшего количества лекарственных средств (антигенов) получать значительный иммунный ответ. Вероятно, такие свойства липидных адъювантов, как безвредность и биodeградируемость делают их весьма перспективными адъювантами. Сегодня липосомальными вакцинами (противогриппозные – «Invivac virosomal», «Lipovaca Influenzal»,

«Inflexal virosomal»; против гепатита А – «Eраxol-Berna») проводится профилактика вирусных заболеваний у десятков миллионов детей. На разных этапах клинического изучения находятся препараты для профилактики дифтерии, столбняка, бешенства и других инфекций.

Исследования последних лет показали способность липосом достаточно свободно проникать в организм путем всасывания через кишечную стенку, легочно-альвеолярную ткань. Сохраняя свою специфическую химическую и биологическую активность, они затем проявляют её будучи «встроенными» в те или иные внутриклеточные или внеклеточные структуры тканей организма. Эти исследования позволили предложить ряд лекарственных препаратов, например, с аэрозольным путем введения. Так, предложено аэрозольно вводить препараты, содержащие антибиотик «Амикацин» (коммерческий препарат), гормон инсулин. Хорошо зарекомендовали себя коммерческие липосомальные препараты антикоагулянтного действия, содержащие низкомолекулярный гепарин («Виатромб», «ЛипоГеп») в форме геля для наружного применения. Достаточно активно развивается направление по использованию липосом в косметологии в виде кремов, гелей, в состав которых включены витамины, ферменты, микроэлементы, аминокислоты и другие биологически активные соединения.

Таким образом, несмотря на некоторые противоречия данных, имеющих в литературе, материалы убедительно демонстрируют перспективность использования липосомальной формы лекарственных препаратов. Проведя анализ можно сформулировать **основные преимущества липосомальных форм**:

- ✓ липосомы снижают токсичность большинства препаратов;
- ✓ позволяют препаратам проникать через мембраны клеток;
- ✓ являются контейнером для доставки лекарственных средств;
- ✓ защищают лекарственные средства от действия ферментов;
- ✓ обеспечивают пролонгированность действия за счет постепенного высвобождения лекарственного средства;
- ✓ защищают от системы РЭС;
- ✓ инкапсулированные в липосомы препараты проходят через гематоэнцефалический барьер, осуществляют солиubilизацию нерастворимых в воде препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баллюзек Ф.В. Нанотехнологии для медицины / Ф.В. Баллюзек, А.С. Куркаев, Л. Сенте. – Санкт-Петербург, 2008.– 103 с.
2. Водовозова Е.Л. Липосомы как наносистемы противоопухолевых агентов мелфалана и метотрексата / Е.Л. Водовозова, Н.Р. Кузнецов, В.А. Кадыков. // Российские нанотехнологии, 2007. Т. 3.– С. 162–172.
3. Гельперина С.Э. Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц / С.Э. Гельперина, В.И. Шве́ц. – Биотехнология, 2009. № 3.– С. 8–23.
4. Григорьева А.С. Способ получения липосомальной композиции, которая обладает гепатозащитным действием / А.С. Григорьева, А.В. Стефанов, Ю.М. Краснополяский. – Патент Украины, 1997; № 14596.
5. Дудниченко А.С. Способ получения липосомальной формы противоопухолевого цитостатика (антибиотика) / А.С. Дудниченко, В.И. Шве́ц, Ю.П. Темиров, Ю.М. Краснополяский. – Патент Украины 1995; № 6700.
6. Дудниченко А.С. Липосомальные лекарственные препараты в эксперименте и клинике / А.С. Дудниченко, Ю.М. Краснополяский, В.И. Шве́ц. – Харьков, РФ-Каравелла, 2001.– 143 с.
7. Иноземцева О.А. Нанокompозитные микрокапсулы, содержащие золотые наночастицы в составе оболочки для биомедицинского применения / О.А. Иноземцева, Г.С. Терентюк, Б.Н. Хлебцов. // Российский Биотерапевтический журнал, 2010. Т. 9, № 3.– С. 11–13.
8. Каплун А.П. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ / А.П. Каплун, Ле Банг Шон, Ю.М. Краснополяский. // Вопросы медицинской химии, 1999. Т.4. № 1.– С. 3–12.
9. Краснополяский Ю.М. Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм в лекарственных препаратах / Ю.М. Краснополяский, А.Е. Степанов, В.И. Шве́ц. // Химико-фармацевтический журнал, 1999. Т. 33. № 10.– С. 20–23.
10. Краснополяский Ю.М. Биотехнология иммунобиологических препаратов / Ю.М. Краснополяский, М.И. Борщевская. – Харьков, Фармитек, 2008.– 312 с.
11. Краснополяский Ю.М. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP / Ю.М. Краснополяский, А.Е. Степанов, В.И. Шве́ц. // Биофармацевтический журнал, 2009. Том 1. № 3.– С. 18–29.

12. Краснополяский Ю.М. Перспективы получения наноразмерных противоопухолевых липосомальных лекарственных препаратов / Ю.М. Краснополяский, А.Е. Степанов, В.И. Шве́ц. – Нанотехнологии в онкологии. М., 2010.– С. 51–54.

13. Краснополяский Ю.М. Современные направления технологии получения наноразмерных препаратов. Промышленная технология лекарств / Ю.М. Краснополяский, В.И. Шве́ц. – Сборник научных трудов. Часть 1. Санкт-Петербург, 2010.– С. 96–99.

14. Кузнецова Н.Р. Влияние углеводных лигандов на цитотоксичность липосом с диглицеридными конъюгатами метотрексата в культурах клеток острой лейкемии человека / Н.Р. Кузнецова, Г.П. Гаенко, С.В. Хайдуков. // Биоорганическая химия, 2009. Т. 35.– С. 542–549.

15. Липосомы в биологических системах / Под ред. Г. Григориадиса, А. Аллисона. – Москва: Медицина, 1983.– 384 с.

16. Марголис Л.Б. Липосомы и их взаимодействие с клетками / Л.Б. Марголис, Л.Д. Бергельсон. – Москва: Наука, 1986.– 240 с.

17. Михайлов Г.А. Технология будущего: использование магнитных наночастиц в онкологии / Г.А. Михайлов, О.В. Васильева. // Бюллетень СО РАМН, 2008. Т. 131.– С. 18–22.

18. Прищеп Т.П. Основы фармацевтической биотехнологии / Т.П. Прищеп, В.С. Чучалин, К.Л. Зайков. – Феникс. Томск, 2006.– 251 с.

19. Сейфулла Р.Д. Фармакология липосомальных препаратов / Р.Д. Сейфулла. – М.: Глобус Континенталь, 2010.– 241 с.

20. Стадниченко А.В. Получение и характеристика липосомальной формы идарубина / А.В. Стадниченко, Ю.М. Краснополяский. – Фармаком, 2007. № 3.– С. 72–76.

21. Стадниченко О.В. Визначення ступеня інкапсуляції у ліпосомах з антрацикліновими антибіотіками, отриманими за допомогою методу «хімічного градієнту» / О.В. Стадниченко, Ю.М. Краснополяський, С.Н. Коваленко. // Фармацевтичний журнал, 2008. № 5.– С. 98–103.

22. Степанов А.Е. Физиологически активные липиды / А.Е. Степанов, Ю.М. Краснополяский, В.И. Шве́ц. – Москва: Наука, 1991.– 136 с.

23. Стефанов А.В. Способ получения липосомального препарата / А.В. Стефанов, Ю.П. Темиров, Ю.М. Краснополяский. – Патент Украины, 1995; № 5654.

24. Стефанов А.В. Спосіб отримання ліпосомального засобу, що містить кверцетин / А.В. Стефанов, Г.С. Григорьева, А.І. Соловьев, Н.В. Пасечникова, А.С. Хромов, Н.Ф. Коначович, Ю.М. Краснопольський. – Патент України, 2006; № 76393.

25. Швец В.И. Липиды в лекарственных препаратах / В.И. Швец, Ю.М. Краснопольский. – Вестник АМН СССР, 1990. № 6.– С.19–28.

26. Швец В.И. Липосомы в фармации. Продукты нанотехнологии / В.И. Швец, Ю.М. Краснопольский. – Провизор, 2008. № 3.– С. 18–24.

27. Швец В.И. Липосомы в фармации. Продукты нанотехнологии / В.И. Швец, Ю.М. Краснопольский. – Провизор, 2008. № 6.– С. 30–37.

28. Швец В.И. От липосом 70-х к нанобиотехнологии XXI столетия / В.И. Швец, А.П. Каплун, Ю.М. Краснопольский. – Российские нанотехнологии, 2008. Т. 3. № 11–12.– С. 643–655.

29. Шимановский Н.Л. Нанотехнологии в современной фармакологии / Н.Л. Шимановский. – Клиническая фармакология, 2009. № 1.– С. 131–135.

30. Alberts D.S. Оценка эффективности и безопасности липосомальных антрациклинов: данные клинических исследований I–II фаз / D.S. Alberts, F.M. Muggia, E.P. Carmichael. // Современная онкология, 2006. Т. 8. № 2.– С. 1–39.

31. Alving C.R. Vaccine adjuvant. In: Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases / C.R. Alving, A. Barrett, L. Stanberry. – Academic Press, Amsterdam, 2009.– P. 115–129.

32. Anton A. Phase I clinical trial of liposomal-encapsulated doxorubicin citrate and docetaxel, associated with trastuzumab, as neoadjuvant treatment in stages II and IIIa, HER2 – over expressing breast cancer patients / A. Anton, A. Ruis, M.A. Segui. – Annals of Oncology, 2009. V. 20. N. 5.– P. 454–459.

33. Arienti C. Activity of Lipoplatin in tumor and normal cell in vitro / C. Arienti, A. Tessei, A. Ravaoli. // Anticancer drug, 2008. V. 19. № 4.– P. 983–990.

34. Barbu E. Polymeric materials for ophthalmic drug delivery: trends and perspective. / E. Barbu, L. Verestinc, T.G. Nevell. – J. Mater. Chem., 2006. Vol. 16. N. 12.– P. 3439–3443.

35. Bangham A.D. Membrane models with phospholipids / A.D. Bangham. – Prog. Biophys. Mol. Biol., 1968; V. 18. N. 1.– P. 29–95.

36. Bi R. Liposomes as a carrier for pulmonary delivery of peptides and proteins J / R. Bi, N. Zhang. – Biomed. Nanotechnol., 2007. V. 3. N. 4.– P. 332–341.

37. Bode C. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes: A new option for neovascular targeting for the treatment of prostate cancer / C. Bode, L. Trojan, C. Weiss. – 2009. V. 22. N. 2.– P.321–326.

38. Boulikas T. Molecular mechanism of cisplatin and liposomally encapsulated form Lipoplatin. Cancer Therapy / T. Boulikas. – 2007. V. 5. N. 3.– P. 351–370.

39. Boulikas T. Clinical overview on Lipoplatin: a successful liposomal formulation of cisplatin / T. Boulikas. // Expert opinion on Investigational Drug, 2009. V. 18. N 10.– P. 1197–1218.

40. Cesarone M. Microcirculatory effects of Viatromb / M. Cesarone, G. Belcaro, S. Errichi. – Angiology, 2007. V. 58. N. 15.– P. 21–26.

41. Cheng X. Antitumor activity and toxicological properties of doxorubicin conjugates to [alpha] [beta]-poly[(2-hydroxyethyl)- L- aspartamide] administered intraperitoneally in mice / X. Cheng, W. Xue, H. Diao. – Anti-Cancer Drug, 2010. Vol. 21. N. 4.– P. 362–371.

42. Chiu G. Encapsulation of doxorubicin into thermosensitive liposomes via complexation with the transition metal manganese / G. Chiu, S. Abraham, L. Ickenstein. – J. of controlled release, 2005. V.194. N 2.– P. 271–288.

43. Chono G. Aerosolized liposomes with dypalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary insulin delivery / G. Chono, R. Fukuchi, T. Seki. – J. of Controlled Release, 2009. V. 137. N. 2.– P. 104–109.

44. Chou T.H. Effect of composition on the stability of Liposomal Irinotecan Prepared pH Gradient method / T.H. Chou, S.C. Chen, I.M. Chu. – J. of bioscience and bioengineer, 2003. V. 95. N. 4.– P. 405–408.

45. Dai C. Factors affecting protein release from microcapsule prepared by Liposome in alginate / C. Dai, D. Wang, Y. Zhao. – Colloids Surf. Biointerfaces, 2005. V. 42. N. 3–4.– P. 253–258.

46. Fenske D.B. Encapsulation of Drugs Within Liposomes by pH-Gradient Techniques. Liposome Technology. Third Edition. V. 2. Entrapment of Drugs and other materials into Liposomes. Edited by Gregoriadis G. / D.B. Fenske, P.R. Cullis. – «Informa», New York – London, 2007.– P. 27–50.

47. Fortin-Ripoche J.P. Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in mice: Feasibility / J.P. Fortin-Ripoche, M.S. Martina, F. Gasbau. // Radiology, 2006. V. 139. N 3.– P. 415–424.

48. Garsia-Marco I.A. Efficacy and safety of Liposomal cytarabine in lymphoma patients with central nervous system involvement from lymphoma / I.A. Garsia-Marco, C. Paniso, E.S. Garsia. // *Cancer*, 2009. V. 115. N. 12.– P. 1892–1898.

49. Gregoriadis G. Liposome Technology. Volume 1 Liposome preparation and related techniques / G. Gregoriadis. – London: Healtheare, 2007.– 324 p.

50. Gregoriadis G. Liposome Technology. Volume 2 Entrapment of drugs and other materials into liposomes / G. Gregoriadis. – London: Healtheare, 2007.– 397 p.

51. Gregoriadis G. Liposome Technology. Volume 3 Interaction of liposomes with the biological milieu / G. Gregoriadis. – London: Healtheare, 2007.– 434 p.

52. Grigoryeva G.S. Liposomal formulation for application on ophthalmology. International Liposome Society. Liposome Advances: Progress in drug and Vaccine Delivery / G.S. Grigoryeva, A.V. Stefanov, N.F. Konakhovych. – London, 2006.– P. 38–39.

53. Grygorieva A.S. Real Nanopharmacology: Liposomic medicines in clinic. International Liposome Society. Liposome Advances: Progress in drug and Vaccine Delivery / A.S. Grygorieva, N.F. Konakhovych, Yu.M. Krasnopolsky. – London, 2009.– P. 70.

54. Goncalves C. Dextrin Nanoparticles: studies on the interaction with murine macrophages and blood clearance / C. Goncalves, E. Torrado, T. Martins. – *Colloids and Surfaces B: Biointerface*, 2010. Vol. 75. N. 2.– P. 483–489.

55. Halwani M. Bactericidal efficacy of liposomal aminoglycosides against *Burkholderia cenocepacia* / M. Halwani, C. Mugabe, A.O. Arghani. – *J. of Antimicrobial chemotherapy*, 2007. V. 60. N. 4.– P. 760–769.

56. Heurtault B. Design of a liposomal Candidate Vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in Triggering systemic and Lung Mucosal immunity / B. Heurtault, P. Gentine, I.S. Thomann. – *Pharmaceutical Research*, 2009. V. 26. N. 2.– P. 276–285.

57. Ishida T. Development of pH –sensitive liposomes that efficiently retain encapsulated doxorubicin in blood / T. Ishida, Y. Okada, T. Kobayashi. – *International J. of Pharmaceutics*, 2006. V. 309. N 1.– P. 94–100.

58. Jain K.K. Nanotechnology – based Drug delivery for cancer / K.K. Jain – *Technology in Cancer Res*, 2005. V. 4. N. 4.– P. 407–416.

59. Jamil H. Liposomes: The next generation / H. Jamil, S. Sheikh, I. Ahmad. // Presented at the American Chemical Society, January 2004.– P. 37–39.

60. Johnston M.I. Therapeutically optimized rates of drug release can be achieved by varying the drug-to-lipid ratio in Liposomal vincristine formulation / M.I. Johnston, S.C. Semple, S.K. Klimuk. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 2006. V. 1758. N 3.– P. 55–64.

61. Kaasgaard T. Liposomes containing alkylated methotrexate analogues for phospholipase A2 mediated tumor targeted drug delivery / T. Kaasgaard, S.S. Jensen, T.L. Andersen. – *Chem. Phys. Lipids.*, 2009. V. 157. N. 1.– P. 94–103.

62. Kadry A.A. Treatment of experimental osteo-mielitis by liposomal antibiotics / A.A. Kadry, S.A. Al-Euwayeh, A.R. Abd-Allah. – *J. of Antimicrobiol. Chemotherapy*, 2004. V. 10. N. 12.– P. 1093–1099.

63. Kim E.S. A phase II study of STEALTH cisplatin(SPI-77) in Patients with advanced non-small cell lung cancer / E.S. Kim, C. Lu, F.R. Khuri. // *Lung Cancer*, 2001. V. 34. N 3–4.– P. 427–432.

64. Koromila G. Heparin incorporating liposomes as delivery system of heparin from PET-covered metallic stents: Effect on haemocompatibility / G. Koromila, G.P. Michanetris, Y.F. Missirlis. – *Biomaterials*, 2006. V. 27. N. 12.– P. 2525–2533.

65. Liposomes. Second Edition. / Edited by Torchilin V. and Weissig V. / Oxford, 2003.– 396 p.

66. Madden T.D. Liophilization of Liposomes. In liposomes edited by A.S. Janoff / T.D. Madden, N. Boman. – Basel, New-York, 1999.– P. 261–282.

67. Maha F.M. Liposomal methotrexate hydrogel for treatment of localized psoriasis: preparation, characterization and laser targeting / F.M. Maha, S. Manal, R. Maha. // *International medical J. of experimental clinical research*, 2008. V. 14. N. 2.– P. 166–174.

68. Mescheder A. Method of administering a cationic liposomal preparation comprising paclitaxel / A. Mescheder, M. Karrasch. // Patent WO, 2006; № 117220.

69. Mesmer A.H. Use of Liposome solution for enhancing the activity and or reducing the to toxicity of drugs / A.H. Mesmer, A. Scheller, J.M. Krassnopolski. // Eur. Patent, 1998; № 0116219.

70. Messerer C.L. Liposomal Irinotecan: Formulation development and Therapeutic Assessment in murine Xenograft model of coloteral cancer / C.L. Messerer, E.C. Ramsay, D. Waterhouse. // Clin. Cancer Res, 2004. V. 10. N. 18.– P 6638–6645.

71. Pandey R. Nanotechnology based drug delivery system(s) for management of tuberculosis / R. Pandey, G.K. Khuller. – Indian J. of Experimental Biology, 2006. Vol. 44. N. 3.– P. 357–366.

72. Phillips W.T. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute / W.T. Phillips, R.W. Klipper, V.D. Awasthi. – J Pharmacol Exp Ther, 1999. V. 288 N. 2.– P. 665–670.

73. Plosker G.L. Pegylated liposomal Doxorubicin: A review of its use in the treatment of relapsed or refractory multiple Myeloma / G.L. Plosker. // Drugs, 2008. V. 68. N. 11.– P. 2535–2551.

74. Peyrl A. Pharmacokinetics and Safety of intrathecal Liposomal Cytarabine in children Aged of 3 years / A. Peyrl, R. Saurmann, F. Traunmueller. // Clinical Pharmacokinetics, 2009. V. 48. N. 3.– P. 265–271.

75. Pulkkinen M. Three-step tumor targeting of paclitaxel using biotinylated PLA-PEG nanoparticles and avidin–biotin technology: Formulation development and in vitro anticancer activity / M. Pulkkinen, J. Pikkarainen, T. Wirth. – Eur. J. Pharm. Biopharm, 2008. Vol. 70. N. 1.– P. 66–74.

76. Ravaioli A. Lipoplatin monotherapy: A phase II trial in second line treatment of metastatic non-small cell lung cancer / A. Ravaioli, M. Papi, E. Pasquini. // J. of Clinical Oncology, 2007. V. 25. N. 3.– P. 345–352.

77. Ru B. Spray-freeze dried inhalation of insulin-loaded liposomes for enhanced pulmonary delivery / B. Ru, S. Wei, W. Qun. – J. of drug targeting, 2008. V. 16. N. 9.– P. 9–15.

78. Sahoo S.K. Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer / S.K. Sahoo, W. Ma, V. Labhsetwar. – Int. J. Cancer, 2004. Vol. 112. N. 2.– P. 335–340.

79. Schluep T. Polymeric Tabulysin-Peptide Nanoparticles with Potent Antitumor Activity / T. Schluep, P. Gunawan, L. Mu. – Clin. Cancer Res, 2009. Vol. 15. N. 1.– P. 181–189.

80. Shuhva B. Cationic liposomes as carriers for aerosolized formulations of an anionic drug safety and efficacy / B. Shuhva, V. Gupta, F. Ansan. – European J. of pharmaceutical sciences, 2009. V. 38. N. 12.– P. 165–171.

81. Stathopoulos G. Liposomal oxaliplatin in the treatment of advanced cancer A phase I study / G. Stathopoulos, T. Boulikas, A. Kourvetaris. // J. Anticancer Res, 2006. V. 26. N. 12.– P. 1489–1493.

82. Strieth S. Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes increases tumor microvessel leakiness and improves therapeutic efficacy in combination with Cisplatin / S. Strieth, M.E. Eihhom, A. Wesner. – Clinical cancer research, 2008. V. 14. N. 14.– P. 4603–4611.

83. Tardi P. Liposome loading with metal ions / P. Tardi, S. Johnstone, M. Webb. // Patent USA, 2007; № 7238367.

84. Torchilin V. Recent advances with liposomes as pharmaceuticals carriers / V. Torchilin. – Nature reviews. Drug Discovery, 2005. V. 4. N. 2.– P. 145–160.

85. Tunger D. Oral administration of liposomal insulin / D. Tunger, B. Gumusel, Z. Degim. – J. of nanoscience and nanotechnology, 2006. V. 6. N. 9–10.– P. 2445–2449.

86. Uwe W. Liposomal cancer chemotherapy in dermatology: current status and future prospects / W. Uwe. // Indian J. of Dermatology, 2004. V. 49. N. 2.– P. 109–116.

87. Vail D.M. Pegylated liposomal doxorubicin: proof of principle using preclinical animal models and pharmacokinetic studies / D.M. Vail, M.A. Amantea, G.T. Colbern. // Semin Oncol., 2004 V. 31. N. 1.– P. 16–35.

88. Verberne G. Liposomal as potential biolubricant additives for wear reduction in human synovial joints / G. Verberne, A. Schroeder, G. Halperin. – Wear., 2010. V. 268. N. 7–8.– P. 1037–1104.

89. Verschraegen C.F. Clinical evaluation of the delivery and Safety of aerosolized liposomal 9-nitro-20(s)-camptothecin in patients with advanced pulmonary malignancies / C.F. Verschraegen, B.E. Gilbert, E. Loyer. // Clin. Cancer Res., 2004. V. 10. N. 14.– P. 2319–2326.

90. Zamboni W.C. Liposomal, Nanoparticle and Conjugated Formulations of Anticancer Agents Clin / W.C. Zamboni. // Cancer Res., 2005 V. 11. N 23.– P. 8230–8234.

Навчальне видання

КРАСНОПОЛЬСЬКИЙ Юрій Михайлович
ДУДНИЧЕНКО Олександр Сергійович
ШВЕЦЬ Віталій Іванович

**ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ:
БІОНАНОТЕХНОЛОГІЯ У ФАРМАЦІЇ І МЕДИЦИНІ**

Навчальний посібник
для студентів (у т. ч. іноземних)
біотехнологічного напрямку

Російською мовою

Роботу до видання рекомендувала *М. Г. Зінченко*
В авторській редакції
Комп'ютерна верстка *Л. В. Северіна*

План 2011 р., поз. 62/92-11

Підп. до друку 30.06.11. Формат 60 × 84 1/16. Папір офісний.
Riso-друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 13,3. Наклад 100 прим.
Зам. № 297. Ціна договірна.

Видавничий центр НТУ „ХП”
Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 3657 від 24.12.2009 р.
61002, Харків, вул. Фрунзе, 21

Друкарня НТУ “ХП”, 61002, Харків, вул. Фрунзе, 21