

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ НАПРАВЛЕНИЯ В СОЗДАНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ЛИПИДНОЙ ПРИРОДЫ

В.И.ШВЕЦ, Ю.М.КРАСНОПОЛЬСКИЙ, А.П.КАПЛУН, А.Е.СТЕПАНОВ

Государственная академия тонкой химической технологии им.М.В.Ломоносова, Москва

В работе обобщены результаты собственных многолетних исследований в ряду сложных фосфолипидов и гликолипидов из природного биологического сырья. Предложены новые подходы к синтезу инозитсодержащих сфингофосфолипидов, гликофосфатидилинозитов, полусинтетическому синтезу фосфоглицеридов. Разработан промышленный метод выделения высокочистого фосфатидилхолина, освоен промышленный выпуск ряда липидных препаратов. Инкапсулирование препарата ДОФА в липосомы увеличивает эффективность его действия на модели МПТП-индуцированного паркинсонизма у мышей.

Ключевые слова: фосфолипиды, гликофосфолипиды, липосомы, биологические мембраны, биотехнология и липидные препараты.

Поиск и создание новых классов лекарственных средств с улучшенными фармакологическими свойствами составляют одно из актуальных направлений медико-биологической науки. В последнее время во многих исследовательских центрах развернут широкий фронт работ фундаментального и поискового характера, направленный на всестороннее изучение обширной группы природных биологически активных соединений, объединяемых общим классификационным названием "липиды". Остался в прошлом многолетний взгляд на липиды, как на пассивное депо для снабжения клетки энергией. Современные представления, основанные на результатах глубоких структурно-функциональных исследований, отводят липидам и их надмолекулярным клеточным образованиям - биологическим мембранам - важнейшую роль в функционировании основных биохимических механизмов, определяющих и регулирующих физиологическое состояние клетки, ее реакции и взаимодействие как с соседними клетками, так и с факторами окружающей внешней среды.

Отдельные типы природных липидных веществ, их биологически активные молекулярные фрагменты и модифицированные синтетические аналоги привлекают большое внимание исследователей как перспективный источник для конструирования лекарственных и диагностических препаратов нового поколения [1].

На кафедре биотехнологии академии тонкой химической технологии в течение ряда лет выполняется цикл работ по химии и биохимии липидов различного типа. Накопленные данные в этом научном направлении позволили перейти к разработке диагностических и лекарственных препаратов на основе липидных соединений для последующей передачи в практическую медицину.

Среди огромного множества природных липидов наиболее биологически значимыми являются фосфо- и гликофосфолипиды. Фосфолипиды, хотя и в относительно небольших количествах, повсеместно распространены в клетках органов и тканей всех типов живых организмов, причем повышенные концентрации этих природных веществ наблюдаются в таких важных органах, как головной мозг, спинной мозг, сердечная мышца, печень, легкие и др. Строение фосфо- и гликофосфолипидов характеризуется одновременным присутствием гидрофобных и гидрофильных фрагментов в составе одной молекулы, а также разнообразием химического строения каждого из этих фрагментов, что в значительной степени определяет важную роль полярных липидов в структуре и функционировании клеточных мембран.

каждого из этих фрагментов, что в значительной степени определяет важную роль полярных липидов в структуре и функционировании клеточных мембран.

Применение липидов для целей практической медицины основано на их высокой биологической активности и проводится с учетом конкретного вида функциональной активности, проявляемой тем или иным видом липидов в биологической системе.

К настоящему времени, основываясь на результатах многочисленных исследований, можно выделить следующие функции липидов в живом организме, представляющие практический интерес в плане поиска новых лекарственных и диагностических средств:

1. Транспортировка лекарственных средств, инкапсулированных в липосомы, для адресной доставки препарата в орган, или клетку - мишень при различных заболеваниях. Выведение патогенных веществ и токсических продуктов из органов и тканей при помощи липидных молекул с целью нормализации обменных процессов при атеросклерозе, гиперлипидемии и ряде других патологий.
2. Обеспечение энергией метаболических реакций в процессе жизнедеятельности клетки.
3. Фосфо- и гликофосфолипиды, а также их метаболиты служат во многих случаях тонкими регуляторами физиологической активности клетки в ходе ее ответа на изменение условий внешней среды.
4. Липиды имеют ярко выраженные свойства адъювантов и влияют на состояние иммунной системы организма. Отдельные виды высокоочищенных липидов обладают антигенными свойствами, поскольку высокая иммуногенность липидов в ряде случаев приводит к образованию специфических противолипидных иммуноглобулинов, которые могут использоваться в иммунологических реакциях для диагностики распространенных инфекционных заболеваний.
5. Введение липидов в организм восстанавливает и стабилизирует состав и структуру биологических мембран, которые обычно подвергаются деградации при нарушении нормального течения метаболических процессов вследствие возникновения патологических состояний организма.
6. Поверхностно-активные свойства фосфолипидов позволяют создавать на их основе биологически активные эмульсии различного состава для парэнтерального питания, для кровезамещения и других медицинских целей.

Перечисленные здесь виды проявления функциональной активности липидов, конечно, носят достаточно условный характер, поскольку большинство липидных препаратов, как правило, дает одновременно несколько биологических эффектов при применении. Кроме того, при дальнейших исследованиях веществ липидного ряда весьма вероятно обнаружение ранее не выявленных биологических функций при нормальных или патологических состояниях организма.

Препараты липидной природы только начинают широко осваиваться в медицинской практике, поэтому для этого сравнительно нового класса лекарственных веществ весьма актуальным становится вопрос о сырьевых источниках и методах препаративного получения отдельных видов фосфолипидов и гликолипидов.

В настоящее время существуют два основных подхода на пути решения проблемы доступности соединений липидной природы:

Во-первых: Химический и ферментативный синтез (а также сочетание этих методов) фосфолипидов и гликолипидов исходя из низкомолекулярных соединений относительно простого строения.

Во-вторых: Выделение фосфолипидных фракций и индивидуальных фосфолипидов и гликолипидов из природного биологического сырья.

Синтетические исследования в ряду сложных фосфолипидов и гликолипидов проводятся в нашей лаборатории на протяжении длительного времени. В ходе этих работ классическими методами химии тонких органических соединений последовательно реализованы синтезы всех главных структурных типов фосфоглицеридов и многих представителей ряда сфинголипидов и гликолипидов. В качестве примера можно привести приоритетные синтезы важнейших в биологическом отношении фосфолипидов: фосфатидилинозита трифосфата мио-инозита - внутриклеточного вторичного передатчика в биологическом цикле фосфоинозитидов [2]. Были также разработаны и выполнены первые синтезы инозитсодержащих гликофосфолипидов сложного строения фосфатидилинозитманнозида, специфичного антигенного гликолипида из фосфолипидного пула патогенных штаммов микобактерий [2].

Одной из новых разработок в этом направлении является синтез инозитсодержащих сфингофосфолипидов с использованием новых методологических подходов для образования фосфоэфирной структуры липида на базе соединений трехвалентного фосфора. Эта методология была применена для первых полных синтезов церамидфосфоинозита и маннозида церамидфосфатидилинозита [3,4].

В последнее время в круг наших научных интересов включен недавно открытый вид гликолипидов - гликозилфосфатидилинозиты, обеспечивающие в клетке специфические механизмы связывания и функционирования важнейших мембраноактивных белков. Построение структуры гликофосфолипида осуществлялось путем последовательного использования эффективных методов образования гликозидной связи и формирования фосфодиэфирной связи. В результате работы предложен общий подход к получению гликозилфосфатидилинозитов природного строения и с модифицированной структурой [5].

Дальнейшее развитие синтетических исследований в области фосфо- и гликофосфолипидов привело к интеграции разработанных методических подходов с использованием опыта работы лаборатории по синтезу нуклеозидов и ретиноидов, что дало выход на сложные соединения нового структурного типа, соединяющие в молекуле остатки нескольких биологически активных веществ. В рамках этого направления проведен синтез серии конъюгатов биологически активных нуклеозидов с природными липофильными соединениями [6].

Ранее было установлено, что введение молекулярных фрагментов диглицеридов, витаминов и стероидов на 5'-конец нуклеозидов (например, азидотимидин) через фосфоэфирную и сложноэфирную связь повышает противовирусную активность нуклеозида и улучшает внутриклеточный транспорт таких конъюгатов.

Разработанные подходы для химии фосфо- и гликофосфолипидов дали возможность синтезировать практически все известные типы этих веществ в индивидуальной молекулярной форме. Следует отметить, что синтезы в этом ряду соединений отличаются многостадийностью (20-25 стадий), трудоемкостью и завершаются, как правило, получением целевых веществ в небольших количествах.

В настоящее время более перспективным представляется полусинтетический подход к получению фосфоглицеридов разного строения на основе легкодоступного природного фосфатидилхолина. На ключевых стадиях таких синтезов обычно используют фосфолипазы A_2 и D . Этим методом синтезированы фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и фосфатидилглицерин. Метод применялся для препаративного получения фосфоглицеридов со специфическими репортерными [7,8] группами, например, с флуоресцентными и спиновыми метками. Эти соединения широко используются как эффективные инструменты в молекулярно-биологических исследованиях липидзависимых систем, в частности, для определения эффективности липидов и липидных смесей как лекарственных и диагностических средств.

Другой удобный метод синтеза флуоресцентно-меченых фосфоглицеридов состоит в модификации природных липидов в условиях реакции Фриделя-Крафтса [9]. В этих условиях получены модифицированные полимеры, содержащие ароматические группы с присоединенными остатками природных фосфоглицеридов. Таким же методом синтезированы ионофорные фосфоглицериды. В первом случае полимеры, модифицированные фосфолипидами, можно использовать в аффинной хроматографии для выделения некоторых труднодоступных белков, ферментов и низкомолекулярных соединений, имеющих сродство к фосфоглицеридам. Полимер с иммобилизованным фосфатидилсерином применялся для выделения высокоочищенной протеинкиназы С.

Во втором случае на основе ионофорного дифосфатидилглицерина были получены иммуноспецифические электроды, которые в дальнейшем могут быть использованы для эффективной диагностики некоторых заболеваний (красная волчанка, сифилис) [10]. По-видимому, на этом препаративные возможности химического и ферментативного подхода к синтезу липидов ограничиваются.

Задача получения фосфолипидов и гликолипидов в масштабах, необходимых для промышленного выпуска медицинских препаратов липидной природы, решена в нашей работе путем создания технологических методов выделения их из биологических сырьевых источников [1]. Разработанные технологии выделения основаны на свойстве липидов и некоторых их производных селективно растворяться в органических растворителях. Таким образом, был разработан промышленный метод выделения высокочистого фосфатидилхолина из яичного желтка и кардиолипина из сердечной мышцы крупного рогатого скота [1].

Экстракционные методы не во всех случаях дают возможность получить липиды необходимой степени чистоты, особенно в индивидуальной молекулярной форме. Эта проблема была успешно решена при использовании различных видов хроматографии (адсорбционная, распределительная, гель-фильтрация, ионообменная, высокоэффективная жидкостная хроматография, аффинная, хроматография на неомитине или аминосилхроме и т.д.) [11].

В качестве удачного примера такого подхода можно привести разработанную технологию выделения труднодоступного представителя фосфоинозитидов - фосфатидилинозитдифосфата, из которого далее ферментативным гидролизом получали трифосфат инозита (активный метаболит биологического цикла фосфоинозитидов) в препаративных количествах [12,13].

В течение последних 15 лет нами и харьковским предприятием "Биолек" (Украина) проводятся совместные разработки, направленные на создание промышленных технологий получения липидных субстанций как основы для конструирования липидных и диагностических препаратов. Исследования включают вопросы определения биологической активности липидных субстанций, способы их стабилизации и длительного хранения, стандартизации физико-химических параметров и т.п. В этом плане проводилось изучение влияния на биологическую активность липидов таких факторов как химическое строение молекулы и ее заряд, степень ненасыщенности жирнокислотных остатков, состав и природа продуктов перекисного окисления и некоторых других факторов.

В результате проведенных совместных работ на предприятии "Биолек" освоен промышленный выпуск следующих липидных препаратов [1]:

1. фосфатидилхолин - выделен из яичного желтка, содержит не более 5-8% примесей фосфолипидной природы; метод выделения основан на осаждении суммарного экстракта липидов солями тяжелых металлов.

2. фосфатидилэтаноламин - выделен из мозга крупного рогатого скота или яичного желтка, содержит не более 3-5% примесей фосфолипидной природы; метод

выделения основан на экстракции суммарных фосфолипидов с последующей хроматографической очисткой.

3. фосфатидилсерин - выделен из мозга крупного рогатого скота, содержит не более 3-5% примесей фосфолипидной природы; метод выделения основан на очистке суммарного экстракта липидов осаждением солями тяжелых металлов с последующей очисткой на ДЕАЕ-сефадексе А 25.

4. фосфатидилинозит - выделен из пекарских дрожжей, содержит не более 3-6% примесей фосфолипидной природы. Метод выделения основан на экстракции суммарных липидов с последующей очисткой фосфатидилинозита на сорбенте, содержащем аминогруппы.

5. дифосфатидилглицерин - выделен из сердечной мышцы крупного рогатого скота, содержит не более 5-10% примесей фосфолипидной природы; метод выделения основан на осаждении суммарных липидов органическими растворителями и солями тяжелых металлов.

6. сфингомиелин - выделен из мозга крупного рогатого скота, содержит не более 3-5% примесей фосфолипидной природы; метод выделения основан на экстракции суммарных липидов органическими растворителями с последующей очисткой на силикагеле.

7. фосфатидная кислота - получена из яичного фосфатидилхолина путем гидролиза фосфолипазой D; количество примесей других фосфолипидов не превышает 5%.

8. лизофосфатидилхолин - получен из яичного фосфатидилхолина путем гидролиза фосфолипазой А; количество фосфолипидных примесей не превышает 2-4%;

9. ганглиозиды - выделены из мозга крупного рогатого скота; содержат не более 3-5% примесей; метод выделения основан на экстракции суммарной фракции ганглиозидов с последующей ее очисткой хроматографией на аминосилохроме и других сорбентах; из суммарной фракции ганглиозидов хроматографией на Q-сефарозе, QAE-сефадексе А-25, кизельгеле-60 выделены индивидуальные фракции ганглиозидов GD1a, GD1b, GT1b, GM1, GM3.

Помимо перечисленных липидов предприятием "Биолек" также производятся фосфолипидные смеси из яичного желтка, мозговой ткани, легких и печени крупного рогатого скота, эритроцитарной массы человека и животных, плаценты человека, а также фосфолипидные смеси из растительного сырья [1]. Освоена технология получения липосом как "пустых", так и "нагруженных" определенными медикаментами с целью повышения эффективности их действия.

На основе подробного изучения взаимосвязи химического строения, физических свойств и биологической активности соединений липидного ряда удалось предложить и сконструировать ряд оригинальных и диагностических препаратов. Так, освоен выпуск высокочувствительных липидных антигенов для массовой серодиагностики сифилиса. Изучены антигенные свойства индивидуальных высокоочищенных липидов и их смесей. Выявленные противолипидные антитела позволяют проводить диагностику ряда тяжелых инфекционных заболеваний (туберкулез, гонорея, микоплазмозы) и патологических состояний (выявление противомозговых антител) [1].

Проведено изучение эмульгирующих свойств фосфолипидов и предложены липидные эмульгаторы для получения биологически активных эмульсий, используемых как кровезаменители и для парентерального питания) [14].

Определение адъювантных свойств липидов позволило разработать способы получения специфических противолипидных, антирабических и противэритроцитарных антисывороток [1].

Исследовано влияние гликолипидов кислой природы ганглиозидов на восстановление функциональной активности мозговой ткани при механических травмах,

на устойчивость организма к вирусу бешенства, на усиление пролиферации клеток печени, на иммуномодулирующее действие при гриппе [15]. В настоящее время ведутся поисковые работы по созданию лекарственной формы специфического действия на основе ганглиозидов.

В опытах на лабораторных животных отрабатывается методика использования природных фосфолипидных смесей для возможности регенерации печени, пораженной механическим или химическим воздействием. Эти эксперименты ставят целью создание высокоэффективных препаратов - аналогов лечебного средства "Эссенциале" [1].

Разработан способ получения фосфолипидного препарата фактора активации тромбоцитов [1].

Использование индивидуальных молекулярных форм фосфолипидов - (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилсерина, дифосфатидилглицерина, фосфатидилинозита) для формирования липосом позволило создать новый класс лекарственных и диагностических средств на основе соответствующих липосомальных форм; например, липосомальные препараты для ингаляторного применения при заболеваниях дыхательной системы и для лечения болезней печени человека и сельскохозяйственных животных [1].

Изучаются условия применения липосомального лечебного препарата, созданного на основе фосфолипидов из животного сырья. Препарат предотвращает комплемент-индуцированный гемолиз. Выявлен липидный компонент, определяющий действующее начало препарата, при этом найден класс органических веществ, обладающих антигемолитической активностью. Некоторые вещества из этого класса входят в состав известных медицинских препаратов, используемых для других медикаментозных целей. Препарат предполагается использовать для лечения гемолитической болезни новорожденных, для стабилизации лекарственных форм, содержащих эритроциты, для ослабления побочного действия препаратов, применение которых сопровождается явлением гемолиза [16].

Совместно с лабораторией академика РАМН Г.Н.Крыжановского ведется работа по созданию липосомальных форм препаратов для лечения болезни Паркинсона (Дофасомы). Известный препарат ДОФА, инкапсулированный в липосомы, в эксперименте на мышах с МПТП индуцированным паркинсонизмом проявляет лечебный эффект в дозах на порядок меньших, чем интактный ДОФА (леводопа). При этом наблюдается пролонгированное действие препарата [17]. Можно предположить, что катехоламины, инкапсулированные в липосомы, защищены от преждевременной деградации ферментами периферических тканей. Было обнаружено, что введение Дофасома ускоряется метаболизм ДОФА в структуре. Получены данные, что липосомальная форма ДОФА легче преодолевает гемато-энцефалический барьер. Характерно, что ДОФАмин, который вообще не дает терапевтического эффекта при введении в организм, в липосомальной форме становится также эффективным как и ДОФА.

Проводились работы по созданию цитостатиков (антибиотики антрациклинового ряда, препараты на основе платины, 5 фторурацил), инкапсулированных в фосфолипидные липосомы для изучения возможности использования их при лечении злокачественных заболеваний в эксперименте и клинике [18]. Экспериментальное изучение показало снижение общей токсичности ЛД₅₀ липосомальной формы доксорубина (41±2,3 мг/кг), свободной формы доксорубина - (18,2±2,0 мг/кг), липосомальной формы 5-фторурацила (426±14 мг/кг), свободной формы 5-фторурацила (317±12 мг/кг). Отмечено также снижение и кардиотоксичности: содержание липосомальной формы доксорубина в сердце животных через 2 часа после введения было в 2,0-2,5 раза ниже, чем при введении свободной формы. Изменение токсичности может быть связано с изменением фармакокинетики липосомальных форм. Обнаружено

продолжительное действие липосомальных форм препаратов по сравнению со свободными формами цитостатиков. Так, было пролечено 125 человек с раком желудочно-кишечного тракта. Достигнуто снижение частоты осложнений при химиотерапии липосомальными формами цитостатиков. Угрожающих жизни больных осложнений не было ни в одном случае. Тошнота и рвота при использовании липосомальных форм цитостатиков были непродолжительны и не требовали фармакологической коррекции. Ни у одного из пациентов не развились алоpecia или мукозиты, не возникала одышка. Несмотря на работу только с больными IV стадии удалось увеличить продолжительность жизни на 30% в сравнении с больными, леченными свободной формой препарата. Морфологические исследования, выполненные на клеточно-тканевом и субклеточном уровне, показали, что использование липосомальной формы препаратов оказывает более выраженный терапевтический эффект.

В ходе этой части работы были предложены оригинальные промышленные способы получения липосомальных форм цитостатиков, позволившие создать апиrogenные и стерильные препараты, которые были стабильны при контрольном хранении в течение двух лет. Получены положительные результаты при использовании липосомальных форм препаратов в экспериментах на животных с перевиваемой линией АКЭ. Выживаемость животных по сравнению с контролем при использовании липосомальных форм цитостатиков возросла на 50-60%.

Изложенные данные касаются только части результатов исследований в этой области и не исчерпывают других возможных направлений научно-практического применения фосфолипидов и гликолипидов в медицине. Успешное использование липидных соединений при лечении таких тяжелых и распространенных заболеваний как онкологические, инфекционные, СПИД и ряда других, наглядно демонстрируют большие потенциальные возможности этого класса природных физиологически активных веществ для создания новых эффективных лекарственных и диагностических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Степанов А.Е., Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Физиологически активные липиды. - М., 1991.
2. Швец В.И., Степанов А.Е., Крылова В.Н., Гулак П.В. мио-Инозит и фосфоинозитиды. - М., 1987.
3. Frantova A.Y., Stepanov A.E., Bushnev A.S. et al. // Tetrahedron Lett -1992. - V.33, N 24. - P.3539-3542.
4. Zamyatina A.Y., Shvets V.I. // Chem.Phys. Lipids.- 1995. - V.76, N3. - P.225-240.
5. Шастина Н.С., Эйнисман Л.И., Каширичева И.И. и др. // Биоорган. химия. - 1995. - Т.21, N8. - С.641-650.
6. Осколкова О.В., Замятина А.Ю., Есинов Д.С. и др. // Биоорган. химия. - 1996. - Т.22 N4. - С.307-313.
7. Каплун А.П., Шрагин А.С., Лютик А.И. и др. // Докл. АН СССР. - 1983. - Т.273. N2. - С.350-351.
8. Шрагин А.С., Кузьмина Ю.В., Борин М.Л. и др. // Биоорган. химия. - 1985. - Т.11, N2. - С.1669-1674.
9. Богомолов О.В., Якунина Н.Б., Каплун А.П. и др. // Биоорган. химия. - 1988. - Т.14 N8. - С.1059-1067.
10. Кузьмина Ю.В., Каплун А.П., Саенко В.А. и др. // Биоорган. химия. - 1988. - Т.14 N8. - С.1068-1074.
11. Кляцицкий Б.А., Межова И.В., Старкова Э.П. и др. // Биотехнология. - 1989. - Т.5. N11. - С.27-36.
12. Klyashchitsky B.A., Mezova I.V., Krasnopol'sky Y.M. et al. // Biotechnol. and Appl. Biochem. - 1991. - V.14, N3. - P.284-295.
13. Шрагин А.С., Парнова Р.Г., Селищева А.А. и др. // Укр. биохим. журнал. - 1988. - Т.60 N2. - С.72-77.
14. Элькина Б.И., Каплун А.П., Швец В.И. // Хим.-фарм. журнал. - 1986. - N11. - С.1338-1347.
15. Мензелев Р.Ф., Божков А.И., Звонкова Е.Н. и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 1995. - N4. - С.427-443.
16. Иванова Н.Н., Петров В.И., Каплун А.П. и др. // Вестник АМН СССР. - 1990. - N6. - С.38-40.
17. Борисова Н.Б., Каплун А.П., Богомолов О.В. и др. // Биоорган. химия. - 1996. - Т.22 N10-11. - С.851-856.
18. Дронов А.П., Дудниченко А.С., Мезин И.А. и др. // Бюллетень эксп. биологии и медицины. - 1996. - N1. - С.85-88.

BIOTECHNOLOGICAL DIRECTIONS IN THE DEVELOPMENT OF LIPID DRUGS AND DIAGNOSTIKS.

V.I. Shvets, Yu.M. Krasnopolsky, A.P. Kaplun, A.E. Stepanov

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow.

The paper summarizes own results of studies on phospholipids and glycolipids from natural biological sources. New approaches for synthesis of inositol-containing sphingophospholipids, glycophosphatidylinositols, semisynthetic synthesis of phosphoglycerols have been introduced. New industrial method of phosphatidylcholine isolation and production of number of lipid preparations were developed. Incorporation of DOPA into liposomes increases efficacy of its action in the medication of MPTP-induced parkinsonism in mice.

Key Words: phospholipids, glycophospholipids, liposomes, biological membranes, biotechnology and lipid preparations.