

КОНСТРУИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРОНИКНОВЕНИЯ В МОЗГ

Н.В.БОРИСОВА, А.П.КАПЛУН, В.И.ШВЕЦ

Московская государственная академия тонкой химической технологии
им. М.В.Ломоносова, 117571, Москва, просп. Вернадского, 86;

Настоящий обзор охватывает ряд подходов, разработанных с целью доставки препаратов в мозг. В том числе, рассматриваются молекулярная модификация, окислительно-восстановительные системы и липосомы. Отдельно изложены возможные средства доставки лекарств через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) в случае болезни Паркинсона.

Ключевые слова: системы доставки, мозг, гемато-энцефалический барьер, химическая модификация, окислительно-восстановительные системы, липосомы, болезнь Паркинсона.

Сокращения: ГЭБ - гемато-энцефалический барьер; ДОФА - L-3,4-дигидроксифенилаланин; ДПФХ - дипальмитоил-фосфатидилхолин; ДСФХ - дистеароилфосфатидилхолин; Ктх - катехолы; Лс - липосомы; ОВС - окислительно-восстановительные системы; ПЭГ - полиэтиленгликоль; ТГА - 9-амино-1,2,3,4-тетрагидроакридин; ФИ - фосфатидилинозит; ФХ - яичный фосфатидилхолин; Хол - холестерин.

Новые классы лекарственных соединений, а с ними и усовершенствованные лекарственные формы - таков результат взаимодействия химиков, биологов, фармацевтов и врачей. Одной из первых и до сих пор наиболее распространенной бесспорно считается таблетированная форма. За этой общепризнанной технологией стоит необходимость знания точной дозировки потенциального лекарственного средства в устойчивой и приемлемой форме [1]. Передозировка же опасна риском усиления побочных явлений.

Однако ряд болезней, в том числе появившиеся в последнее время, требуют внедрения новых систем доставки веществ, включая антиопухолевые агенты, цитокинины, иммуномодуляторы, вакцины и т.п. Эти системы призваны селективно обеспечивать орган-мишень переносимым лекарством в малых дозах и за ограниченное время. К их основным свойствам относятся:

- повышенная комфортность лечения за счет более точного, легкого и менее частого дозирования;
- повышенная безопасность, обусловленная сокращением контакта лекарственного препарата с тканями и клетками, находящимися за пределами направленного действия препарата;
- разнообразие и, вместе с тем, индивидуальный подход в выборе необходимых концентраций лекарственного средства;
- эффективная абсорбция в органе-мишени;
- терапевтическая концентрация препарата поддерживается на заданном уровне достаточно долго.

Традиционные формы введения лекарственных препаратов в организм в конце 70-х гг. дополнились еще одной - матричной [2]. Процесс инкапсулирования состоит из 2 стадий: 1) измельчение лекарственного вещества с последующим распределением в дисперсионной среде и 2) покрытие его частиц полимерной пленкой. В качестве материала для изготовления матриц и микросфер вполне применимы гидрофобные вещества типа восков, но с точки зрения контроля характеристик высвобождения лекарства исключительно благоприятными представляются полимеры такие, как поли(L/(DL)-молочная кислота) с/без трибутилцитратом, сополимер L-молочной и гликолевой кислот.

Использование микоадгезивных полимеров - технология будущего, которая позволит уменьшить захват препарата органами желудочно-кишечного тракта [3]. В последнее время были также созданы не адсорбируемые полимерные конъюгаты, высвобождение вещества из которых идет с помощью азоредуктазы [4]. Фермент синтезирует колония бактерий, химически связанная с полимерным носителем.

Не так давно появились работы по использованию наночастиц - коллоидных полимерных носителей [5]. Предполагается, что за счет их малого размера можно повысить стабильность и абсорбцию системы переноса, а также осуществить количественный перенос активного вещества в клетки [6]. В работе [7] отмечалось значительное усиление фармакологической активности и пролонгированное действие инсулина и гидрокортизона, связанных с наночастицами.

Наночастицы, в частности, могут быть получены из ацетата холестерина [8]. После впрыскивания органического раствора в водную фазу получают устойчивую эмульсию (м/в). Микроэмульсии и липопротеиды низкой плотности обычно используют для транспортировки к клетке жирорастворимых лекарственных веществ.

Использование смешанных мицелл предпочтительно в случае получения коллоидной системы, размер частиц которой колеблется в пределах 30-50 нм. Однако часто при хранении (3-4 °C) в смешанных мицеллах и эмульсиях идет образование кристаллов, что делает их непригодными для терапевтического использования [9].

В последнее время появились данные по использованию в качестве средств доставки лекарств биосом [10]. Они состоят из липидного матрикса, включающего в себя как полярные, так и неполярные липиды (например, соевый лецитин и моноацилглицерин), которые формируют частично упорядоченную липофильную фазу. Липидный матрикс может содержать до 50% воды (по массе). Спонтанное образование биосом происходит в условиях избыточного количества воды. Биологическая эффективность биосом была продемонстрирована на примере биосом с включенным низкомолекулярным гепарином. Они могут включать как гидрофильные, так и гидрофобные вещества в зависимости от состава биосом.

Универсальным характером по отношению к природе переносимых молекул отличаются также Лс. Липосомы как средства доставки лекарств обладают весьма широкими функциональными возможностями, в том числе они могут выступать в качестве депо для доставки веществ в мозг. Однако транспорт лекарственных веществ в мозг осложнен вследствие наличия гемато-энцефалического барьера.

Применение молекулярной модификации для создания потенциальных антипаркинсонических пролекарственных форм L-ДОФА и дофамина.

Непроницаемость ГЭБ затрудняет медикаментозное лечение ряда заболеваний, в том числе болезни Паркинсона. При паркинсонизме значительно снижено содержание эндогенного дофамина - 2-(3,4-дигидроксифенил)этиламина в стриатуме мозга. Экзогенное введение дофамина не может быть применено для лечения, т.к. он не проникает через ГЭБ [11, 12]. Поэтому на практике применяют его биологический

предшественник - L-ДОФА (ДОФА) - L-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-аминопропионовой кислоты [13-15].

Малая липофильность ДОФА и низкая растворимость в воде [16], с одной стороны, и повышенная неустойчивость к окислению и действию ферментов [17], с другой, явились причиной поиска новых потенциальных пролекарственных форм ДОФА. На сегодня существует несколько подходов по изменению свойств как ДОФА, так и дофамина. В частности, исторически первым стал метод химической модификации, которым в первую очередь были получены простые и сложные алифатические эфиры ДОФА, способные преодолевать ГЭБ [18-22].

Потенциальные пролекарственные формы должны быть хорошо растворимы как в липидах, так и в воде; устойчивы к окислению. Кроме того, отнесение их кровотоком через периферические органы не должно сопровождаться химической деградацией, метаболизмом или гидролизом. Тем самым должна обеспечиваться доставка лекарства в мозг в количестве, необходимом для терапевтического эффекта. Они сами и продукты их метаболизма должны быть нетоксичны. Вышеперечисленные свойства, как установлено, были присущи некоторым синтезированным эфирам ДОФА/дофамина. Для их получения обычно вводится несколько защитных групп. Ацетильную и пивалоильную ((CH₃)₃C-CO-) группы чаще всего используют для защиты фенольных гидроксильных групп; метильные и бензильные защитные группы - для карбоксильной группы, тогда как для NH₂-группы применяют формильную защитную группу [23].

Диацетильные производные обычно получают введением ацетила с помощью ацетилбромидом в CF₃COOH [24], в уксусной кислоте с постепенным добавлением хлористого ацетила [25, 26] или хлористого ацетила в присутствии неорганических кислот (H₃PO₄/H₂SO₄) [27]. В работе [28] для этих целей использовали RCOCl (R = ацетил, изобутирил, бутирил, пальмитоил) в CHCl₃ в присутствии p-CH₃C₆H₄SO₃H. В литературе описывается также синтез диацильных производных (CH₃(CH₂)₂COCl) с предварительным введением бензильной защитной группы в свободную COOH-группу и бензилоксикарбонильную - в NH₂-группу [29]. Было установлено, что β-(3,4-диацетилоксифенил)-L-аланин способствует длительному удерживанию ДОФА в мозге [30]. Антипаркинсоническим действием обладали также α-3,4-(RO)₂C₆H₃-CH₂-CH(NH₂)CO₂R' (R=изобутирил, (CH₃)₃CCO; RR=оксалил; R'=H, Et или CH₂Ph) [31].

Дипивалоилоксиметилловый эфир дофамина был получен трех-стадийным синтезом [32]. При этом трет-бутилоксикарбонильную группу использовали для блокирования NH₂-группы. Защитную группу вводили реакцией с трет-бутилазидоформиатом в присутствии основания (например, триэтиламина, диметиламинопиридина или N-метилморфолина в полярных апротонных растворителях (диоксане, тетрагидрофуране, диметилформамиде или дихлорметане) при нагревании [33, 34].

В работе [35] было показано, что α-3-(3-гидрокси-4-пивалоилоксифенил)аланин обладает пролонгированным действием (в 2-3 раза выше, чем раствор ДОФА). Кроме того, биодоступность этого малотоксичного соединения превышала в 1,4 раза соответствующее значение для ДОФА.

Ортоэфиры дофамина (ортоацетат или ортопропионат) могут быть получены трех-стадийной перэтерификацией с предварительной защитой аминогруппы трифторацетатом. Полученные ортоэфиры гидролизуются спонтанно при pH>5. Устойчивость к гидролизу в водной среде проявляли диметилтиометилловые эфиры дофамина. Однако среди ацильных производных дофамина (пропионил, *n*-бутирил, изобутирил и пивалоил) (даны в порядке возрастания липофильных свойств) пропионильные производные отличаются наибольшей устойчивостью. Поэтому их используют в газо-жидкостной хроматографии [36]. Получают пропионильные

производные с помощью пропионового ангидрида или пропионилхлорида [37]. Известно также, что для их качественного и количественного анализа КТХ могут быть использованы N-бансильные и N-дансильные производные [38].

Обработка тионилхлоридом в MeOH или BzlOH используется для синтеза метильных и бензильных эфиров. Известно также, что алкилирование ДОФА диазометаном проходит с большим выходом в среде метанол-диэтиловый эфир (1:1), т.к. растворимость аминокислоты в этих условиях выше, чем в чистом эфире/этаноле или смеси этанол-вода [39].

В ходе экспериментов [40] было установлено, что N-формильная защитная группа предпочтительна по сравнению, например, с N-фталильными и бензилоксикарбонильными группами, т.к. N-формилирование характеризуется высокими выходами и, кроме того, формильная группа удаляется в мягких условиях (HCl в метаноле) [41]. Получение же фталильных производных ДОФА сопровождается рацемизацией.

В работе [42] для образования пролекарственной формы дофамина было предложено использовать его производное с наращенным углеводородным фрагментом (насыщенная цепочка из 16÷26 атомов углерода). Как было установлено, за счет имеющейся амидной связи в полученном конъюгате гидролиз его в желудке практически не происходит. Наличие жирного хвоста обеспечивает проникновение пролекарственной формы через ГЭБ.

В литературе известны также многочисленные исследования [43, 44], согласно которым введение раствора ДОФА может быть заменено на введение ДОФА-содержащих пептидов. Таких, например, как короткие пептиды с NH_2 - и COOH -терминальными группами Gly-Gly-DOPA, Gly-DOPA-Gly, DOPA-Gly-Gly, DOPA-DOPA-DOPA, L-Pro-DOPA-DOPA [45], а также пироглутамиловым N-терминальным и карбоксамидным C-терминальным группами [46]. С целью предотвращения окисления исходной молекулы ДОФА использовали Cbz-защитную группу (CbzCl in Et₂O, NaOH, -10° C) [47]. Синтез осуществляли стандартными методами пептидной химии [48]. В литературе также описывается получение этиловых эфиров N-бензилоксикарбонил- α - γ -глутамил-3,4-дигидрокси- α -фенилаланина, α - γ -глутамил-3,4-ди-(4-метоксибензилокси)- α -фенилаланина и N-ацетил- α - γ -глутамил-3,4-диизобутирилокси)- α -фенилаланина [49, 50].

Несмотря на большое количество синтезированных пептидов, до сих пор не удалось определить их потенциальную значимость и взаимосвязь структуры с активностью.

Структура и связанные с ней физико-химические свойства производных могут иметь значение не только для активности того или иного лекарственного препарата, но и общих фармакологических свойств (в том числе тех, с которыми могут быть связаны побочные эффекты и токсическое действие) [51]. Немаловажной также остается проблема доставки кровотоком потенциальных липофильных пролекарственных форм в мозг. С этой целью могут быть использованы различные средства доставки.

Проникновение веществ в мозг с помощью ОВС.

Одно из возможных решений проблемы доставки веществ в мозг может быть найдено с помощью метода, в основе которого лежит получение окислительно-восстановительных систем (ОВС). Направленный транспорт веществ в ц.н.с. посредством химических систем доставки был разработан Бородом с соавторами [51, 52]. Этот способ позволяет создавать формы с замедленным выделением активного вещества. Существует 2 основополагающих подхода к проблеме транспорта лекарств в мозг с помощью ОВС.

I. Этот подход включает в себя синтез производных лекарственных форм, содержащих в качестве интегральной части молекулы лекарства пиридиновый гетероцикл. Впервые этот метод был применен для доставки N-метилпиридиния-2-карбальдоксима (2-МПК), для которого в качестве пролекарственной формы выступало

дигидропиридиновое производное. Таким образом, 2-МПК был превращен из гидрофильного в липофильное соединение [53, 54].

Эти эксперименты получили дальнейшее развитие в разработке новых ОВС, в которых остаток никотиновой кислоты использовался в качестве переносчика химически связанного с биологически активным соединением по следующей схеме (1).

Согласно схеме 1 любое лекарственное соединение [D] химически связывается с четвертичной солью пиридиния [QC]⁺ с образованием пролекарственной формы [DQC]⁺, которая затем восстанавливается до дигидро-про-пролекарственной формы [D-DHC]. Возможен также альтернативный путь непосредственного связывания лекарственного соединения [D] с дигидропереносчиком [DHC]. Липофильность [D-DHC] в 1000 раз превышает соответствующее значение для соли. Это свойство - необходимое условие проникновения восстановленной формы через ГЭБ. С течением времени в организме восстановленная форма окисляется *in situ* при участии кофермента NADH до четвертичной соли [D-QC]⁺, которая, находясь в 1) кровотоке быстро элиминируется и выводится из организма, а в 2) ГЭБ задерживается в силу своего размера и полярности. Дальнейший гидролиз [D-QC]⁺ приводит к высвобождению [D] и его метаболизму.

За счет такого метаболизма в теле остается лишь малое количество вещества D. Тем самым достигается значительное уменьшение его побочных эффектов. В качестве редокс-переносчиков может служить не только ядро дигидропиридина, но и, например, изохинолина, хинолина, метаболизм которых происходит аналогично (схема 2).

Таким образом, настоящая модель, обозначенная ранее как подход I, позволяет значительно увеличить эффективность направленного транспорта веществ за счет снижения их концентрации в периферических органах. Однако [DHC] плохо растворим в воде и, следовательно, существенной остается проблема доставки полученных систем к ГЭБ. С этой целью был разработан новый подход II [55].

II. Этот подход основывается на применении α , β , γ -циклодекстринов (циклические гексамеры, гептамеры и октамеры глюкозы соответственно) для доставки ОВС к ГЭБ. Связывание в таких конъюгатах происходит за счет включения ОВС в гидрофобную область циклодекстрина [56]. Полагают, что такие комплексы стабилизированы различными межмолекулярными силами (Ван-дер-Ваальсовы), водородными связями и гидрофобными взаимодействиями [57]. В результате комплексообразования ОВС с гидроксипропил, гидроксизтил, глюкозил, мальтозил или мальтотриозил производных β - и γ -циклодекстринов становится возможным:

1. Стабилизировать производные дигидропиридина, которые очень чувствительны к окислению;
2. Осуществлять доставку липофильных соединений в виде чистых водных инъекций, а не с добавлением диметилсульфоксида, пропиленгликоля или этанола как ранее, что вызывало ряд побочных эффектов;
3. Уменьшить захват введенных производных дигидропиридина в периферических органах за счет замедленного процесса высвобождения лекарства.

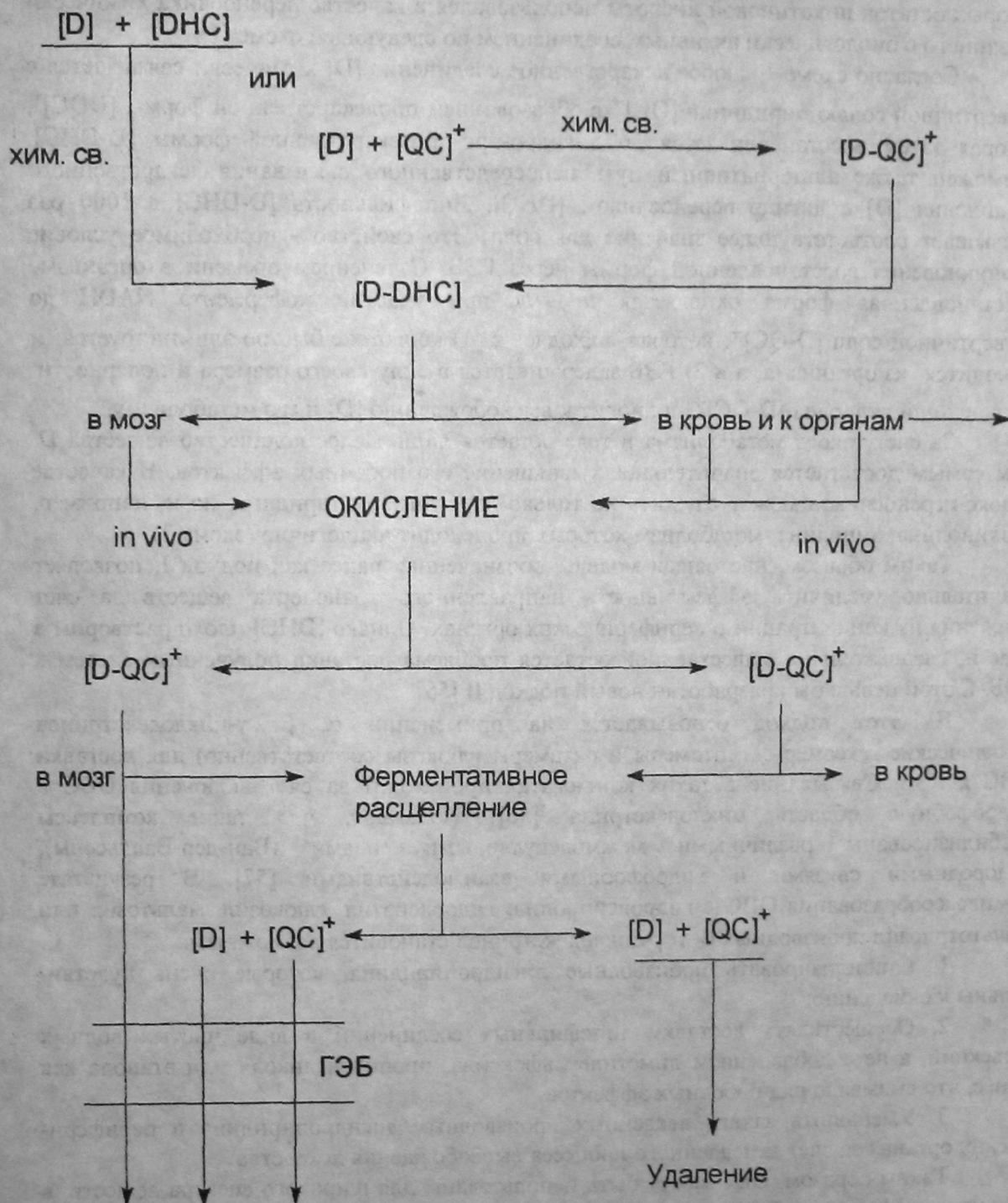
Таким образом, ОВС могут быть использованы для широкого спектра веществ, в том числе дофамина и ДОФА.

Липосомы как инструмент доставки лекарственных препаратов в мозг.

Доставка лекарств в мозг необходима при терапии заболеваний центральной нервной системы, в т.ч. болезни Альцгеймера, опухолей и т.п. Включение липосом в арсенал возможных средств доставки веществ в мозг представляется весьма перспективным.

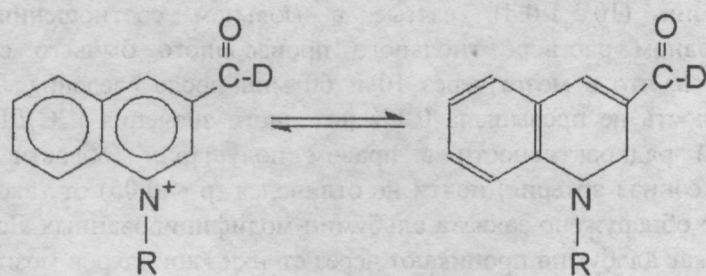
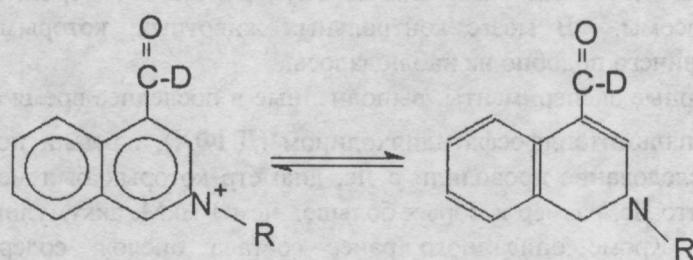
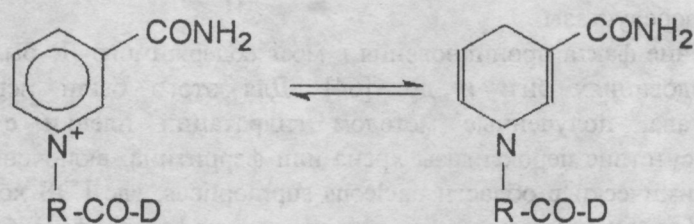
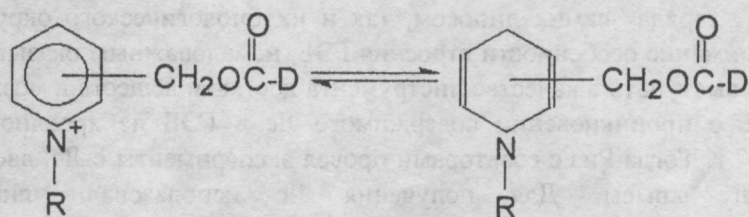
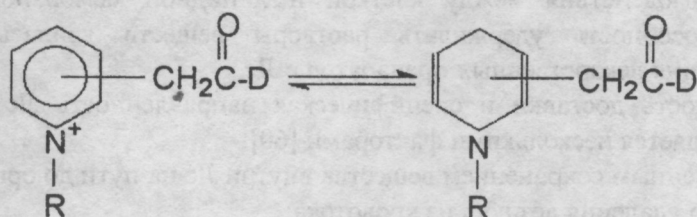
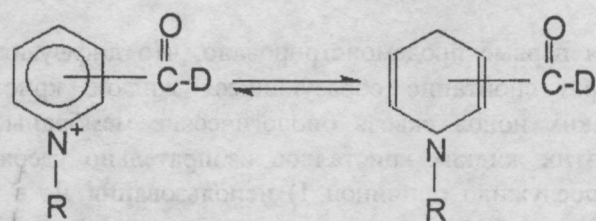
Схема 1

Каскад химических превращений различных форм ОВС в организме



[D] - лекарство,
[QC]⁺ - четвертичная соль пиридиния,
[DHC] - дигидропиридиновое производное

Схема 2



В 1965 г. Бенгхэм впервые продемонстрировало, что диффузия одновалентных катионов и анионов через спонтанно образующиеся жидкие кристаллы лецитина аналогична диффузии таких ионов сквозь биологические мембраны. Позднее стало известно о способности этих жидких кристаллов избирательно удерживать растворы различных веществ, что послужило причиной 1) использования Лс в качестве модели клеточной мембраны и 2) дальнейшего исследования структуры и функциональных особенностей взаимодействия между клеткой и липидной мембраной. Кроме того, обнаруженная способность удерживать растворы веществ явилась первоосновой концепции включения лекарственных препаратов в Лс.

Эффективность доставки и специфическая направленность Лс с включенным лекарством определяется несколькими факторами [60]:

- количественным сохранением вещества внутри Лс на пути до органа-мишени;
- скоростью удаления везикул из кровотока;
- степенью селективности органом-мишенью.

Вышеперечисленные факторы в свою очередь зависят как от состава, размера и поверхностного заряда самих липосом, так и их биологического окружения [61-63]. Принимая во внимание особенности строения ГЭБ, немаловажным оказывается изучение способности Лс выступать в качестве инструмента доставки веществ в мозг.

Впервые о проникновении содержимого Лс в ГЭБ из кровяного русла было сообщено в 1967 г. Тогда Риз с соавторами провел эксперименты с Лс, введенными через хвостовую вену крысы. Для получения Лс использовали липиды состава ФХ:Хол:сульфатид (7:2:1, моль/моль). В мозге было обнаружено 5% включенной в липосомы D-глюкозоредуктазы.

Подтверждение факта проникновения в мозг содержимого Лс было выполнено в дальнейших исследованиях Яги и др. [64]. Для этого были использованы Лс аналогичного состава, полученные методом гидратации пленки с последующим озвучиванием. Присутствие пероксидазы хрена или ферритина, включенных в Лс, было обнаружено гистохимически в области *nucleus supraopticus*, где ГЭБ хорошо различим под микроскопом. Темные гранулы на электронных микрофотографиях были приписаны ферритин-содержащим Лс или каталитическому действию пероксидазы хрена, заключенной в липосомы. В мозге контрольных животных, которым был введен интактный фермент, ничего подобного не наблюдалось.

Однако повторные эксперименты, выполненные в последнее время с теми же Лс, мечеными [^{14}C] дипальмитоилфосфатидилхолином (ДПФХ), не дали положительных результатов [65]. Исследование проводили с Лс, диаметр которых был меньше 1 мкм, поскольку известно, что Лс, размер которых больше, чем 1 мкм, аккумулируясь в мозге, вызывают эмболию. Кроме описанного ранее состава бислоя, содержащего ФХ, холестерин и сульфатид, в этой работе были использованы другие модификации, а именно, ФХ:Хол:фосфатидилинозит (ФИ) (10:5:1), ФХ:Хол:p-аминофенил- α -маннопиранозид (7:2:1), ФХ:Хол:ФИ:N-[4-p-малеинимидофенилбутирил] диолеил фосфатидилэтаноламин (10:5:1:0.4), взятые в мольном соотношении. Такие Лс инкубировали в водном растворе тиольного производного бычьего сывороточного альбумина. Оказалось, что в мозге через 10 и 60 мин после введения Лс различного состава радиоактивность не превышала 0,1% исходного значения [^{14}C]ДПФХ. Причем уровень измеренной радиоактивности в правом полушарии (области введения Лс суспензии, - правая сонная артерия) почти не отличался ($p < 0,05$) от такового в левом. Кроме того, не было обнаружено захвата альбумин-модифицированных Лс, несмотря на то, что такой белок, как альбумин проникают через стенки капилляров мозга посредством активного транспорта.

На основании полученных данных авторами был сделан вывод о несостоятельности предположения о проникновении Лс в мозг, хотя они не исключали возможное использование Лс в качестве циркулирующего депо для лекарственного препарата, который, постепенно высвобождаясь из Лс, способен сам проникать в мозг.

Противоречивость имеющихся данных проявляется при сравнении вышеописанных экспериментов с теми, которые были выполнены другими авторами. Причем в том и другом случае формировали Лс состава ФХ:Хол:р-аминофенил- α -маннопиранозид, взятые в мольном соотношении 7:2:1. Лс были введены внутривентрикулярно. Для идентификации липидов в органах использовали [^3H]галактоцереброзид-меченые Лс. Максимальный уровень радиоактивности (в экстракте липидов из мозга) отмечался по истечении 24 ч после введения Лс. Проведенные эксперименты послужили основанием для сделанного авторами вывода, согласно которому маннозид узнается клетками ГЭБ, и за счет этого Лс проникают в мозг (захватываются лизосомами и клетками глии) [66]. В результате наблюдается обратимое повышение проницаемости барьера для свободных и включенных в Лс веществ.

Данные работы [67] также свидетельствовали, что эффективность транспорта везикул (ФХ/Хол/сульфатид) значительно повышается при введении 2М маннита. В этом случае одним из предполагаемых авторами механизмов действия заключается в блокирующем эффекте маннита на клетки ретикуло-эндотелиальной системы [68, 69]. Возможность избирательного поглощения липосом клетками ГЭБ была также продемонстрирована с помощью термочувствительных Лс.

Функциональные липосомы для лечения опухолей мозга

К функциональным липосомам можно отнести рН- и термочувствительные Лс. Одним из первых исследователей термочувствительных Лс был Вайнштейн [70]. Лс формировали из ДПФХ и дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ). Термочувствительные Лс способны высвобождать включенные соединения в ответ на локальный нагрев (гипертермию). Было показано, что проницаемость ГЭБ напрямую связана с гипертермией, которая в результате приводит к увеличению транспорта веществ из крови в мозговую ткань. Поэтому закономерным явилось появление сочетанного метода, использующего гипертермию и термочувствительные Лс для лечения мозговых опухолей. В частности, метод направленной хемотерапии был применен для лечения злокачественной глиомы [71, 72]. Используемые в этом случае термочувствительные Лс из ДПФХ/ДСФХ (9:1, моль/моль) содержали цисплатин (цис-диаминодихлорплатина (ДДП)) [73]. Липосомы формировали методом инъекции. ДДП, растворенный в растворе NaCl, находился в водной фазе, осмотическое давление в которой было в 1.5 раза выше физиологического осмотического давления.

Мозговая ткань нагревалась с помощью радиочастотной антенны (в виде иглы), которая была помещена в центр мозговой ткани через отверстие, сделанное во время инокуляции опухоли. Термосенсор был установлен на расстоянии 3 мм от антенны для контроля за температурой. Опухоль была нагрета до 41° С, а температура в прилежащей области оставалась ниже 41° С. Исследования проводили на крысах по истечении 10 дней инокуляции опухоли. Нагрев осуществлялся в течение 15 мин, после чего животных 1) подвергали действию гипертермии; 2) вводили в хвостовую вену свободный ДДП, Лс + ДДП или применяли их сочетание (свободный ДДП+гипертермия, Лс+ДДП+гипертермия).

Было установлено, что при одновременном локальном нагреве мозга и введении термочувствительных Лс происходит избирательное высвобождение ДДП в нагретую область мозга. Причем при температуре 40-41° С ~80% включенного ДДП высвобождалось. Уровень ДДП в опухоли в случае Лс+ДДП+гипертермия был максимальным. Эксперименты с трипановым синим показали, что свободное вещество

локализуется в областях, нагретых свыше 44°C , тогда как Лс, содержащие краситель, распределены в области, нагретой до 41°C . Полученные данные свидетельствуют, что термочувствительные липосомы и гипертермия позволяют избирательно уничтожать опухолевые ткани за счет повышения в них концентрации химиотерапевтического препарата.

Попытки лечения глиомы с помощью других функциональных Лс, например рН-чувствительных, не дали положительных результатов. Однако применение иммунолипосом, содержащих противоопухолевый препарат дауномицин оказалось весьма эффективным [74].

Липосомы размером 85 нм, содержащие имид малеиновой кислоты, были стерически стабилизированы с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ). Последний присоединялся по первичной аминогруппе дистеароилфосфатидилэтаноламина. Тиольное производное антител (30 ОХ26 - моноклональные антитела к трансферриновому рецептору) было присоединено к терминальному концу ПЭГ-модифицированного липида посредством тиоэфирной связи. Связывание поверхности Лс, несущих 30 антител, со специфическим трансферриновым рецептором приводило к оптимальному уровню доставки вещества в мозг. Определение [^3H]-дауномицина в мозге по истечении 24 ч после введения иммунолипосом свидетельствовало о захвате мозговой тканью везикул. Аналогичного эффекта не было достигнуто в случае контрольных экспериментов с Ig G (2a).

В литературе также рассматриваются пролипосомы (см. далее) в качестве потенциальных переносчиков соединений, которые используются в нейтронной терапии для лечения ядрами бора опухолевых заболеваний [75]. Для этих целей нашли применение борные производные порфиринов, нуклеозидов, нуклеотидов, а также конъюгаты борсодержащих соединений с макромолекулами, такими, как моноклональные антитела, эпидермальный фактор роста и декстран [76].

В последнее время появились исследования по использованию пролипосом в качестве средства доставки лекарственного препарата в мозг. Так, в работе [77] для получения пролипосом (на основе маннита), с пенициллином был выбран состав, включающий ФХ:Хол:поливинилпропилен:маннозу (5:5:1:2,5) (моль/моль).

В работе Кобаяши [78] использовали липосомы из ФХ:Хол:дипальмитоилфосфатидной кислоты (мольное соотношение, 10/10/1). В качестве модельного лекарства был взят ингибитор ацетилхолинэстеразы - 9-амино-1,2,3,4-тетрагидроакридин (ТГА). Малые одноламеллярные везикулы получали следующим образом. Липидную пленку диспергировали в растворе лимонной кислоты (рН 2,0). После процедуры замораживания-оттаивания (3 раза) липосомальную суспензию пропускали через фильтр с размером пор 100 нм. Затем к суспензии добавляли ТГА и инкубировали в течение 1 ч при 60°C (рН 7,4). Не включенное вещество удаляли с помощью гель-фильтрации. В результате исследования полученных Лс *in vivo* было отмечено уменьшение токсичности и сокращение побочных эффектов при введении Лс, содержащих ТГА. Кроме того, при равной дозе введения (2 мг/кг) везикул и свободного ТГА концентрация вещества в мозге в первом случае была выше, чем во втором. Эффективная концентрация ТГА в мозге пролонгировалась при введении Лс с включенным веществом, хотя наблюдалось накопление ТГА в печени и почках. Полученные данные свидетельствовали о возможном использовании пролипосом для доставки лекарств в мозг.

Использование липосом для лечения болезни Паркинсона.

В ряде исследований [79, 80] отмечалось, что при синдроме Паркинсона снижена активность тирозингидроксилазы, катализирующей превращение тирозина в ДОФА. Замена недостающей тирозингидроксилазы на тирозиназу (фермент, ответственный за

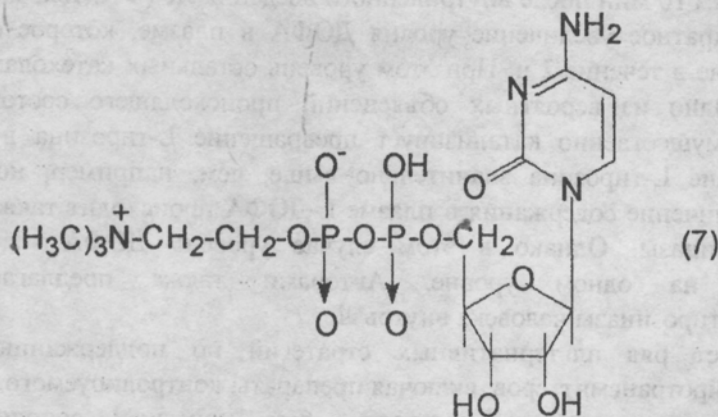
получение меланина) и включение последней в Лс лежит в основе нового терапевтического подхода по лечению экстрапирамидных заболеваний [81, 82]. Так, было отмечено, что через 10 мин после внутривенного введения Лс (ФХ:Хол, 1:0,04 моль/моль) наблюдается 10-кратное увеличение уровня ДОФА в плазме, которое сохранялось на постоянном уровне в течение 2 ч. При этом уровень остальных катехоламинов в плазме не изменялся. Одно из вероятных объяснений происходящего состоит в том, что тирозиназа преимущественно катализирует превращение L-тирозина в ДОФА, т.к. в плазме содержание L-тирозина значительно выше, чем, например, норадреналина и адреналина. Увеличение содержания в плазме L-ДОФА происходит также при введении свободной тирозиназы. Однако в этом случае уровень ДОФА меньше и он не поддерживается на одном уровне. Авторами также предлагается введение рекомбинантной тирозиназы человека внутрь Лс.

Существует ряд альтернативных стратегий по поддержанию повышенных концентраций нейротрансмиттеров, включая препараты контролируемого высвобождения [83, 84]. Для этих целей, в частности, был применен сополимер дофамин-этиленовинилацетат, скорость высвобождения Ктх из которого характеризовалась нулевым порядком [85, 86]. К недостаткам этого метода можно отнести тот факт, что введение такого рода имплантата сопряжено с травмой мозга. Поэтому в качестве альтернативного способа было предложено использование микросфер, сформированных из полимера [87]. Однако *in vitro* кинетика высвобождения Ктх из таких систем не удовлетворяет требованиям для дальнейшего их терапевтического применения. Так, в микросферах из полиамидного полимера 90% дофамина высвобождалось *in vitro* в течение 24 ч. Но более приемлемым оказалось включение дофамина в Лс, пролонгированный эффект которых сохранялся в течение 40 дней (*in vitro*, кинетика первого порядка) [88]. Эти липосомы были имплантированы в частично денервируемый стриатум крыс. Мониторинг высвобождения дофамина *in vivo* проводили с помощью микродиализа. Как было установлено, уровень дофамина во внеклеточной жидкости был выше по сравнению с концентрацией дофамина у контрольных животных, которым были введены пустые Лс. Этот уровень несколько снижался в течение 25 дней, но все равно оставался выше фонового значения. Лс были получены из соевого лецитина, холестерина и диацетилфосфата (молярное соотношение, 4.5:4.5:1). Малые одноламеллярные везикулы формировали сонированием липосомальной дисперсии. Результаты биологических исследований полученных Лс свидетельствовали о частичной ликвидации дефицита дофамина у животных с апоморфин-индуцированной моделью синдрома. Таким образом, было высказано предположение о возможном применении липосомальной технологии для доставки терапевтических средств в мозг.

Согласно имеющимся литературным данным [89], было также проведено исследование некоторых физико-химических свойств липосомальной формы, содержащей цитиколин (1).

Ранее было показано, что цитиколин (1) эффективен при лечении паркинсонизма и других экстрапирамидных заболеваний. Механизм его действия заключается в подавлении ингибирования секреции дофамина в черной субстанции. Сильно полярная природа молекулы цитиколина (1) предотвращает ее проникновение через ГЭБ (не более 0,25% от общего введенного количества). Поэтому авторами была предложена липосомальная технология для получения новой формы цитиколина. Мультиламеллярные везикулы различного состава из заряженных и нейтральных липидов (L- α -дипальмитоилфосфатидная кислота, L- α -дипальмитоилфосфатидилсерин, димиристоилфосфатидилхолин) были получены методом гидратации липидной пленки. Изучены физико-химические свойства полученных Лс. Однако биологических

испытаний, подтверждающих правильность выбора липосомальной формы проведено не было.



Таким образом, в ходе проведенного литературного поиска не было выявлено работ, касающихся изучения физико-химических свойств липосомальной формы ДОФА/дофамина. Хотя, как удалось обнаружить, существует исследование липосомальной формы цитиколина, одного из противопаркинсонических препаратов. Однако эффективность использования липосомальной технологии в этом случае не была подтверждена биологическими испытаниями. Напротив, исследование Лс, содержащих дофамин, ограничилось лишь биологическими экспериментами, причем препарат вводился непосредственно в мозг. Отсюда следует актуальность выполнения работы по изучению физико-химических свойств липосомальной формы ДОФА (и дофамина). В частности, нами были исследованы малые одноламеллярные везикулы, полученные методом гидратации липидной пленки с последующим озвучиванием [90]. В состав Лс входили ФХ:Хол, взятые в мольном соотношении 7:3. Были определены степень включения инкорпорированных ДОФА/дофамина (6-7%), коэффициент распределения между липидной и водной фазами ($K_p=0,006$ для ДОФА и $K_p<0,001$ для ДА (октанол/вода)), а также размер Лс (60-100 нм). ^{31}P -ЯМР исследования показали, что введение ДОФА/дофамина в липосомы не нарушает структуру бислоя. Кроме того, была установлена взаимная антиоксидантная активность ДОФА/дофамина и ФХ. Оказалось, что ДОФА и ДА в исследуемой системе проявляют свойства антиоксидантов по отношению к ФХ [91]. С другой стороны, Лс защищают Ктх от окисления. Этот эффект в значительной степени определяется изоляцией молекул внутри Лс от основного пула растворенного в воде кислорода. В ходе биологических испытаний было показано, что использование Лс с ДОФА как средства доставки в мозг позволяет в 10 раз снизить дозу препарата и увеличить в 2-3 раза время его действия [92]. Однако вследствие малой растворимости в воде ДОФА, необходимо повысить терапевтическую эффективность препарата. Это возможно осуществить, например, с помощью боратных комплексов [93]. Причем, нами было обнаружено, что включение моноДОФА(ДА)боратов аммония или 1-адамантиламмония позволяет увеличить время удерживания активного вещества внутри липосом.

В заключение следует отметить, что, несмотря на разнообразие имеющихся литературных данных, отсутствуют работы по выяснению механизма проникновения самих липосом через ГЭБ. Неоспоримым фактом является способность Лс выступать в качестве депо для доставки веществ в мозг. И это лишь один из возможных путей проникновения веществ в мозг, наряду с такими средствами, как наночастицы, микроэмульсии, смешанные мицеллы, микросферы, ОВС и т.п.

ЛИТЕРАТУРА

1. Robinson D.H., Mauger J.W. (1991) Amer. J. Hosp. Pharm., 48, Suppl. 1. 14-23.
2. Биополимеры. (Под ред. Иманиси Ю.) М: Мир. 1988, 518-535.
3. Ganderton D. (1987) Drug Des. Deliv. N2, 1-7.
4. Pimlott S., Addy M. (1985) Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. N59, 145-148.
5. Kreuter J. (1991). Adv. Drug Del. Rev., 7, 71-86.
6. Speiser P.P. (1991) Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 13, 337-342.
7. Leuroux J.C., Allemann E., Dejaeghere F., Doelker E. (1996) J. Control. Release., 39, N2-3. 339-350.
8. Sjostrom B., Bergenstahl B. (1992) Int. J. Pharm., 84, 107-116.
9. Bloois L. van, Dekker D.D., Crommelin D.J.A. (1987) Acta Pharm. Technol., 33, 136-139.
10. Bohlinder K., Olsson B., Ragnarsson G., Singh S.K., Ohman G.S., Wadsten T., Carlsson A., Herslof B. (1994) Europ. J. Pharm.Sci., 2, 271-279.
11. Rozenkranz R.P. (1990) Proc. West. Pharmacol. Soc., 33, 15-19.
12. Mc Geer, Searl K. (1975) J. Neurochem., 24, 283-288.
13. Barbeau A. (1969) Can. Med. Ass. J., 101, 791-800.
14. Cotzias G.C. (1971) J.Amer. Med. Ass., 218, 1903-1908.
15. Сэндлер М. (1976) ЖВХО им.Менделеева Д.И. N2. 190-196.
16. Friis M., Paulson O. (1981) Eur. J. Clin. Invest., 11, 231-234.
17. Машковский М.Д. (1988) Лекарственные средства. М: Медицина. 1. 163.
18. Repta N. (1987) US Pat. 4,663,349 (Cl 514-535).
19. Bodor N., Kenneth B., Sloan K. (1977) J. Med. Chem., 20, 1435-1445.
20. Agarval J., Nath C. (1981) Pharm. Res. Commun., 13, 937-947.
21. Cooper D.R., Marrel C. (1984) Clin. Neuropharmacol., 7, 89-98.
22. Cooper D.R. (1987) J. Pharm. Pharmac., 39, 627-635.
23. lbrecht R. (1986) Ger.Offen. 3,430,310 (Cl C07D231/54).
24. Sakami T.G. (1942) J.Biol.Chem., 144, 90-107.
25. Bretschneider H., Biemann K. (1950) Monatshefte fur Chemie. B. 51. H.5. 57-65.
26. Holding Wh. (1972) Ger. Offen. 2,330,653 (Cl C0763/100).
27. Winner Thr., Lannach K. (1972) Ger. Offen. 2,263,814 (Cl C07C103/52).
28. Watanabe T., Kono K., Tsukamoto G. (1972) Jpn. Pat. 7,231, 949 (Cl 16 i64).
29. Watanabe T., Kono K., Tsukamoto G. (1971) Jpn. Pat. 7,231,950 (Cl 16C 64).
30. Portelli M., Renzi G. (1974) Ger.Offen 2,330,653 (Cl C07C/ A61 K).
31. Wimmer Th. (1973) Ger.Offen. 2,263,814 (Cl C 07C, A 61 K).
32. Shih Ch. (1980) Diss.abstr.Int.B., 41, 1744-1745.
33. Ihara M., Nakajima S. (1990) J.Pharm. Sci., 79, 703-708.
34. Bodor N., Sloan K. (1982) US Pat. 4,311,706 (Cl 514-513).
35. Ihara M., Tsuchiya Y., Sawasaki Yo. (1989) J.Pharm.Sci., 78, 525-529.
36. Hiemke Chr., Kauert G., Kalbhen D. (1978) J.Chrom., 153, 451-460.
37. Hoffman F. (1975) Swiss Pat. 562,202.
38. Lehmann W.D., Beekey H.D., Schulter H.R. (1976) Anal. Chem., 48, 1572-1575.
39. Sinda J.F. (1975) J.Org.Chem., 40, 3611-3614.
40. Ginos J.Z., Catzias G.C. (1978) J.Med.Chem., 21, 160-165.
41. Bodor N. (1976) US Pat. 3,998,799 (Cl 260-112.5R, C 07C103/52).
42. Shashona V (1989) WO 8907, 938 (Cl A61 K31/16).
43. Fuller W., Verlander M. (1978) Biopolymers., 17, 2939-2943.
44. Goodmann M., Verlander M.//US Pat. 4,125,519 (Cl 528-363, C08669/10). 1978.
45. Yanaihora N., Igarashi T., Kuni T. (1977) Ger.Offen. 2,637,600 (Cl C07 C103/52).

46. Prokai L. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2643-2644.
47. Felix A., Winter D. (1974) *J. Med. Chem.*, **17**, 422-426.
48. Losse G., Barth A. (1963) *J. Praktisch. Chem.*, **21**, H.1-2. 32-35.
49. O'Neill J.J., Veitch F.P., Vagner-Jauregg T. (1956) *J. Org. Chem.*, **21**, (N3), 13-16.
50. Weinhold P. (1987) EP 8,911,401.21 (Cl C07 C237/22).
51. Bodor N., Sloan K., Kaminski J.J., Shih Ch. (1983) *J. Org. Chem.*, **48**, 5280-5284.
52. Bodor N. (1976) *Design of Biopharmaceutical Properties Through Prodrugs and Analogs*. Washington: D.C. p.p. 98-135.
53. Woodard P.A., Winwood D., Brewster M.E., Estes K.S., Bodor N. (1990) *Drug design and del.*, **6**, 15-28.
54. Bodor N. (1981) *Science*, **214**, 1370-1372.
55. Bodor N. (1989) US Pat. 4,824,850 (Cl 514-270, A61 K31/515).
56. Bodor N. (1988) US Pat. 4,727,079 (Cl 514-307. A 61 K31/44).
57. Bodor N. (1989) Eur. Pat. 335,545 (Cl A61 K9/08).
58. Szejtly N. (1982) *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*. Budapest: Acad. Kiado. 234-240.
59. Кулаков В.Н (1988) *Фармак. токсикол.*, **51**, (N2), 99-101.
60. Gregoriadis G. (1995) *Trends in Biotechnology*, **13**, 527-537.
61. Oku N. (1995) *J. Pharm. Soc. Japan*, **115**, 483-498.
62. Липосомы в медицине. (1990) *Вестник АМН СССР*. N6.
63. Ceve G., Blume G., Zellmer S. (1990) *Liposome in Drug Delivery 21 years on/Ed.* Gregoriadis G. et al.
64. Yagi K., Naoi M., Sakai H., Abe H., Konishi H., Arichi Sh. (1982) *J. Appl. Biochem.* **4**, 121-125.
65. Micklus M.J., Greig N.H., Tung J., Rapoport S.I. (1992) *Biochim. Bioph. Acta.*, **1124**, N.1. 7-12.
66. Umezawa F., Eto Y. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 1038-1044.
67. Gomes I., Sharma S.K. (1995) *J. Clin. Biochem. Nut.*, **18**, (N3), 133-144.
68. Sakamoto A., Ido T. (1993) *Brain Res.* **629**. N1. 171-175.
69. Gennuso R., Spigelman M.K., Chinol M., Zappulla R.A. (1993) *Cancer Invest.*, **11**, (N2), 118-128.
70. Weinstein J.N., Magin R.L., Cysyk R. (1980) *Cancer Res.*, **40**, 1388-1395.
71. Lin J.C., Lin M.F. (1982) *Radiat. Res.*, **89**, 77-87.
72. Iga K., Hamaguchi N. (1991) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 1203-1207.
73. Kakimuna K., Tanaka R., Takahashi H., Watanabe M., Nakagawa T., Kuroki M. (1996) *J. Neurosurg.*, **84**, 180-184.
74. Huwyler J., Wu D.F., Pardridge W.M. (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **93**, 14164-14169.
75. Wang J.Y., Xu Y.R., Huang K., Sun L.Y. (1995) *J. Pharm. Pharmac.*, **47**, 1053-1054.
76. Mehta S.C., Lu D.R. (1996) *Pharm. Res.*, **13**, 344-351.
77. Wang J.-Y., Xu Yu-Ru, Huang K., Sun L.-U. (1995) *J. Pharm. Pharmac.*, **47**, 1053-1054.
78. Kobayashi K., Han M., Watarai Sh., Yasuda T. (1996) *Acta Med. Okayama.*, **50**, 67-72.
79. LeWitt P.A. (1989) *Handbook of Experimental Pharmacology.*, **88**, 325-384.
80. Lloyd K.G., Daidson L., Hornykiewicz O. (1975) *J. Pharm. Exp. Ther.*, **195**, 453-464.
81. Miranda M., Amicarelli F., Volpe A.R., Poma A., Masciocco L., Carmignani M. (1993) *Gen. Pharmacol.*, **24**, 1319-1322.
82. Miranda M., Amikarelli F., Poma A., Ragnelli A.M., Arcadi A. (1989) *Chim. Oggl.*, **7**, 9-12.

83. *Cederbaun J.M., Breck L., Kutt H., McDowell F.H.* (1987) *Neurolgy*, **37**, 233-241.
84. *Sabel B.A., Dominiak P., Hauser W., During M.J., Frees A.* (1990). *J. Pharm. Exp. Ther.*, **255**, 914-922.
85. *During M.J., Freese A., Sabel B.A. et al.* (1989) *Ann. Neurol.*, **25**, 351-356.
86. *Freese A., Sabel B.A., Saltzman W.M., et al.* (1989) *Exp. Neurol.*, **103**, 234-238.
87. *McRae-Degueurce A., Hjorth S., Dillon D.L., et. al.* (1988) *Neurosci. Lett.*, **92**, 303-309.
88. *During M.J., Freese A., Deutch A.Y., Kibat P.G., Sabel B.A., Langer R., Roth R.H.* (1992) *Exper. Neurol.*, **115**, 193-199.
89. *Puglisi G., Fresta M., C. La Rosa, Ventura C.A., Panico A.M., Mazzone G.* (1992) *Pharmazie.*, **47**. (H.3.) 211-215.
90. *Борисова Н.В., Каплун А.П., Богомолов О.В., Григорьев В.Б., Юрасов В.В., Никушкин Е.В., Крыжановский Г.Н., Швец В.И.* (1996) *Биоорг. химия.*, **22**, 851-856.
91. *Борисова Н.В., Жигальцев И.В., Богомолов О.В., Каплун А.П., Юрасов В.В., Кучеряну В.Г., Никушкин Е.В., Крыжановский Г.Н., Швец В.И.* (1997) *Биоорг. Химия*, **23**, 289-294.
92. *Юрасов В.В., Подгорный Г.Н., Кучеряну В.Г., Кудрин В.С., Никушкин Е.В., Жигальцев И.В., Сандалов Ю.Г., Каплун А.П., Швец В.И., Крыжановский Г.Н.* (1996) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **122**, 614-617.
93. *Борисова Н.В., Крюков В.И., Каплун А.П., Швец В.И.* (1997) *Биоорг. химия.* в печати.

THE CREATION OF DRUGS TO BE TRANSPORTED TO THE BRAIN

N.V.BORISOVA, A.P.KAPLUN, V.I.SHVETZ

M.V.Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow

This review focused on current of strategies for drug delivery to brain, including molecular modification, redox systems and liposomes. Particularly the transport through the blood-brain barrier relating to Parkinson's disease are being separately considered.

Key words: drug delivery systems, chemical delivery systems, blood-brain barrier, chemical modification, liposomes, Parkinson's disease