

УДК547.9:612.397:678.012

©Коллектив авторов

ЛИПОСОМЫ И ДРУГИЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК СРЕДСТВО ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ.

А.П.КАПЛУН, ЛЕ БАНГ ШОН, Ю.М.КРАСНОПОЛЬСКИЙ*, В.И.ШВЕЦ

Государственная Академия Тонкой Химической Технологии
им. М.В.Ломоносова, Москва.

*Предприятие по производству иммунобиологических
препаратов "Биолек", Харьков

В обзоре рассмотрены основные принципы конструирования лекарственных средств на основе наночастиц. Особое внимание уделено липосомам, так как именно в этой области достигнуты наибольшие успехи. Зафиксировано современное состояние в наиболее интенсивно развивающихся областях: антиканцерогенные и антибактериальные препараты, генная терапия, вакцины.

Ключевые слова: липосомы, наночастицы, лекарственная форма, пассивное нацеливание, антиканцерогенные и антибактериальные препараты, генная терапия, вакцины.

Как и повсюду, успехи в фармакологии связаны с новыми технологиями, то есть с новыми лекарственными формами и технологиями их получения.

Этот краткий обзор посвящен новым лекарственным формам, основанным на использовании наночастиц. До недавнего времени внутривенно вводили только истинные растворы. Присутствие частиц эмульсии или суспензий может привести к закупорке капилляров - эмболии. Легко прикинуть, какими размерами должны обладать частицы дисперсий, чтобы избежать эмболии. Диаметр эритроцитов, которые свободно проходят через любые сосуды, - 7 мкм. С учетом их деформируемости, с запасом считается, что безопасными могут быть дисперсии с размером частиц менее 1 мкм, то есть нано-диапазона.

В зависимости от агрегатного состояния и морфологических особенностей наночастицы делят на: нанокристаллы, нанокапсулы, наносферы и полимерные мицеллы.

Основное внимание в обзоре будет уделено одному из типов нанокапсул - липосомам как контейнерам для доставки лекарственных средств, так как пока только липосомальные препараты дошли до клинических испытаний и некоторые из них лицензированы [1]. Мембрана липосом состоит из природных фосфолипидов, что определяет их многие привлекательные качества. Они нетоксичны, биодергадируемы, при определенных условиях могут поглощаться клетками, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к внутриклеточной доставке их содержимого (рис. 1).

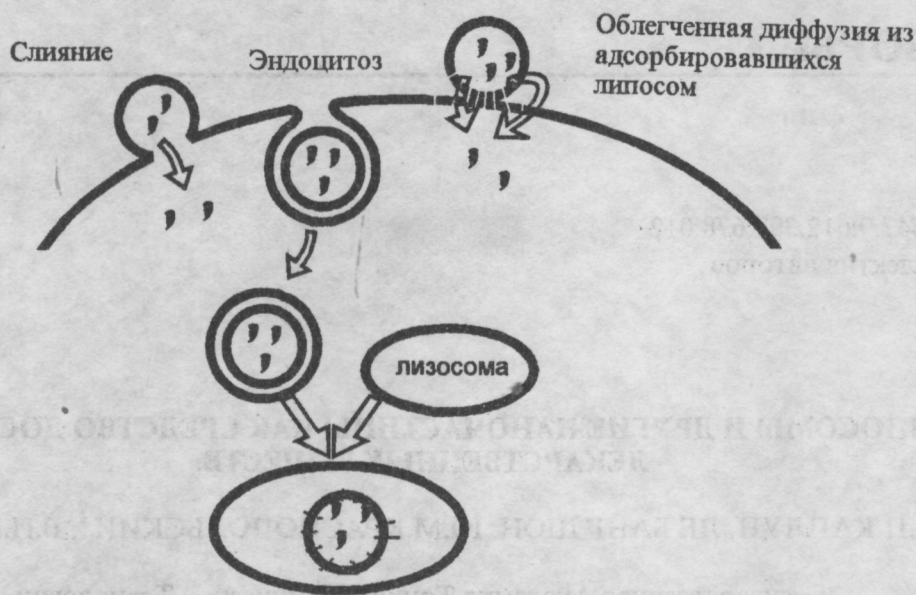


Рисунок 1.
Способы проникновения содержимого липосом в клетку.

Кроме того, вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных биодеструкции в биологических жидкостях. Например, в нашей лаборатории в настоящее время разрабатывается липосомальная форма антипаркинсонического препарата - ДОФА. При использовании традиционных лекарственных форм ДОФА на 80% декарбоксилируется в кровотоке, что снижает его эффективность и приводит к серьезным побочным явлениям. В липосомах же ДОФА не доступен для ферментативной деструкции. Рис. 2 демонстрирует как у мышей с МРТР-индуцированным синдромом Паркинсона снижается один из симптомов - ригидность. Сравнимые результаты достигаются при использовании липосомального препарата в дозах, в 10 раз меньших, чем в случае раствора ДОФА [2-5].

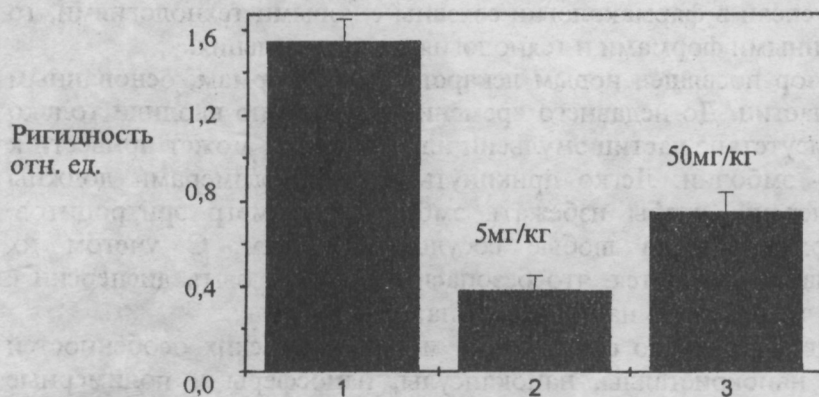


Рисунок 2.
Уменьшение ригидности у мышей с МРТР-индуцированным синдромом Паркинсона при введении препаратов ДОФА, 1. Физиологический раствор (контроль); 2. ДОФА в Лс
3. Раствор ДОФА

Еще одно важное преимущество наночастиц как лекарственной формы - постепенное высвобождение лекарственного вещества, инкорпорированного в них, что увеличивает время его действия. Это также наблюдалось для препаратов ДОФА.

Очень важное свойство липосом (как, впрочем и других наночастиц) стало основой для конструирования эффективных антираковых препаратов. Речь идет о соотношении размеров наночастиц и диаметра пор капилляров.

Так как размер наночастиц больше диаметра пор капилляров, их объем распределения ограничивается компартаментом введения. Например, при внутривенном введении они не выходят за пределы кровотока, т. е. должны плохо проникать в органы и ткани [6, 7]. Следовательно, резко понижается токсическое действие субстанции, ассоциированной с наночастицами. С другой стороны, это свойство может служить основой для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в солидные опухоли и очаги воспаления, так как капилляры, снабжающие эти области кровью, как правило, сильно перфорированы (рис. 3) [8]. Следовательно, наночастицы будут накапливаться в опухоли [9]. Это явление получило название пассивное нацеливание. Таким образом, существует две причины, вследствие которых липосомальные препараты антиканцерогенных субстанций очень эффективны: уменьшение токсичности и пассивное нацеливание.

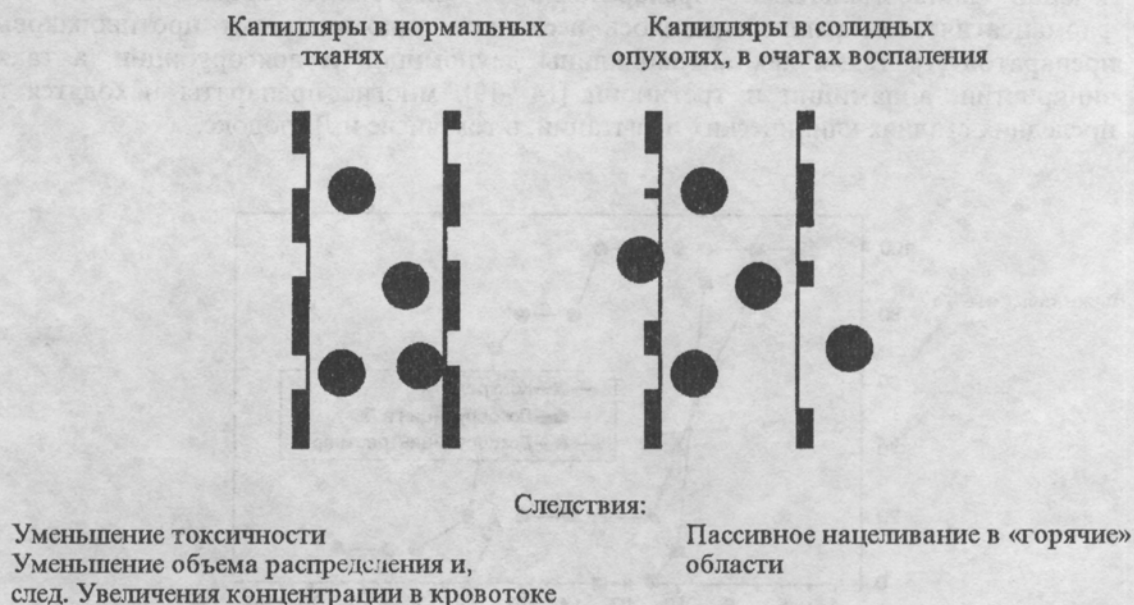


Рисунок 3.
Липосомы проникают через поры капилляров только в «горячих точках».

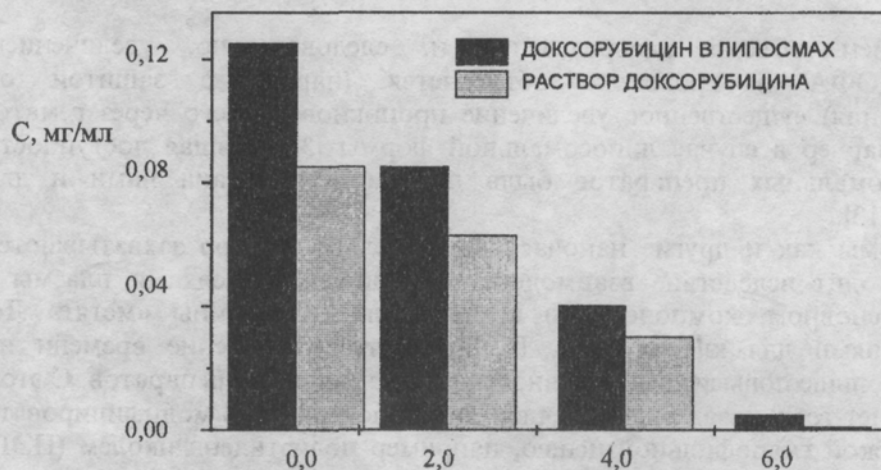


Рисунок 4.
Изменение концентрации доксорубицина в крови при введении его в липосомах и в виде раствора.

Нами совместно с харьковским предприятием "Биолек" разрабатываются липосомальные препараты доксорубина (Липодокс) и других цитостатиков [10, -13]. Было подтверждено, что липосомальные препараты обладают более пролонгированным действием, они менее токсичны, чем растворы, так как в меньшей степени накапливаются в сердце, тогда как в крови их концентрация выше. На рис. 4 приведены данные о концентрации доксорубина в крови после введения раствора и нагруженных липосом. Хорошо видно значительное превышение концентрации доксорубина при введении его в липосомальной форме. Рис. 5 отражает динамику выживания экспериментальных животных с привитой карциномой. Эффект не нуждается в комментариях. Уменьшение же токсичности в случае использования липосомального препарата позволяет повысить дозу без заметных токсических эффектов. Все это дает качественно новые результаты при лечении липосомальными препаратами. В настоящее время на мировом фармацевтическом рынке появилось несколько липосомальных противораковых препаратов [1], таких как антрациклины дауномицин и доксорубин, а также винкристин, аннамицин и третиноин [14 -19], многие препараты находятся на последних стадиях клинических испытаний, в том числе и Липодокс.

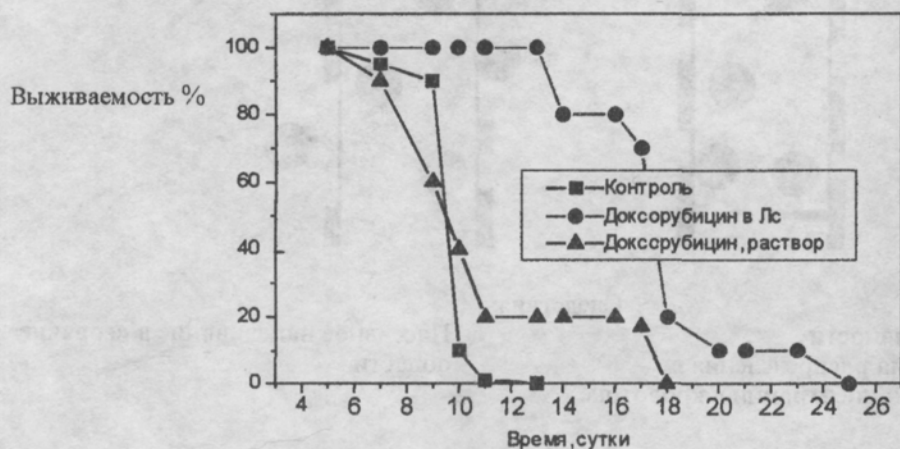


Рисунок 5.

Выживаемость мышей с карциномой при введении препаратов доксорубина в липосомах, в виде раствора.

Уменьшением объема распределения и, следовательно, увеличением концентрации ДОФА в кровотоке объясняется (наряду с защитой от декарбоксилирования) существенное увеличение проникновения его через гемато-энцефалический барьер в случае липосомальной формы [3]. Лучшая доступность мозга для липосомальных препаратов была продемонстрирована нами и для цитостатиков [12, 13].

Но липосомы как и другие наночастицы довольно быстро захватываются РЭС. Это происходит вследствие взаимодействия липосом с белками плазмы - опсонидами (в основном, компонентами комплемента). Опсоны «метят» Лс, делают их мишенями для клеток РЭС. Понятно, что увеличение времени их циркуляции еще больше повысит эффективность липосомальных препаратов. С этой целью несколько лет тому назад было предложено их поверхность модифицировать полимерами с гибкой гидрофильной цепью, например полиэтиленгликолем (ПЭГ) [20-24]. Для этого используются специальные модифицированные липиды, например, фосфатидилэтаноламин (ФЭ), конъюгированный с ПЭГ.

На рис. 6 представлена схема такой «стерически стабилизированной» липосомы, а на следующем рисунке (рис. 7) результаты подобной модификации [25]. Как видно из приведенных графиков, белки (в данном случае меченый родамином

овальбумин) не могут добраться до поверхности Лс. Гибкие молекулы ПЭГ создают в примембранной области избыточное осмотическое давление. Липосомы как бы становятся невидимыми для РЭС (отсюда и название "stealth liposomes"). Характерно, что полимер с большей жесткостью (декстран) не оказывает существенного влияния.

Рис. 8 демонстрирует насколько увеличивается время циркуляции стерически стабилизированных липосом [26]. Несмотря на высокую себестоимость по крайней мере один препарат на основе стелс-липосом уже прошел клинические испытания и одобрен FDA. Речь идет о препарате Doxil (SEQUUS Pharmaceuticals, USA), предназначенного для лечения саркомы Капоши, первичного рака печени, рака простаты, рецидивирующем раке молочной железы, неподдающемся терапии раке яичка.

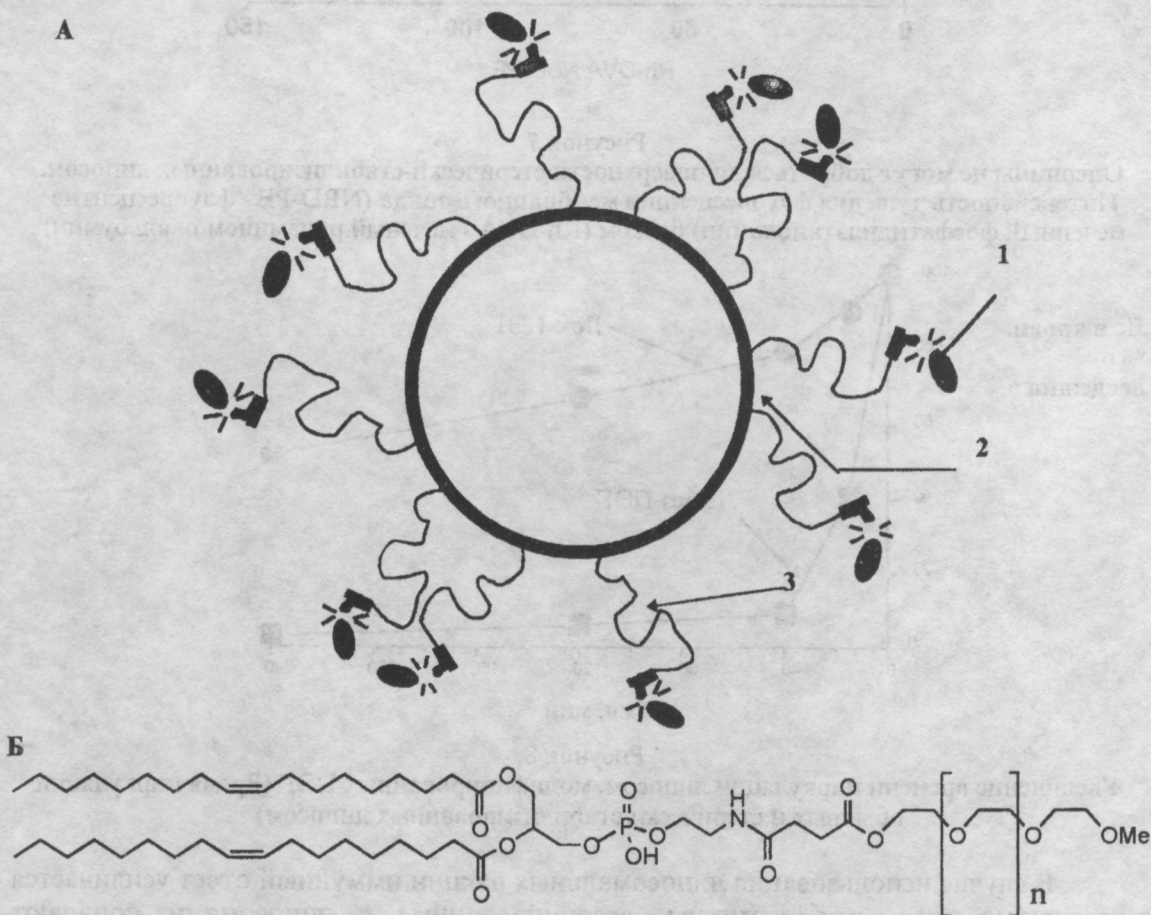


Рисунок 6.

А. Стерически стабилизированные липосомы (Stealth liposomes). Белки (1) не могут достичь поверхности липосом (2) из-за избыточного осмотического давления в примембранном пространстве, создаваемом гибкими цепями (3) иммобилизованных полимеров (например, ПЭГ). Б. Фосфатидилэтаноламин, конъюгированный с ПЭГ, используемый для получения стерически стабилизированных липосом.

Очень эффективны липосомы для препаратов, мишенью которых являются клетки РЭС, так как именно эти клетки интенсивно поглощают наночастицы. Такая ситуация складывается при внутриклеточной микробной инфекции и при вакцинации. Доставка амфотерицина В непосредственно в зараженные клетки приводит к прекрасным результатам при системных грибковых инфекциях, висцеральном лейшманиозе. Во многих странах Европы уже можно купить подобные препараты (AmBiosome, ABLC, Amphocil). Последний лицензирован и для российского рынка [1].

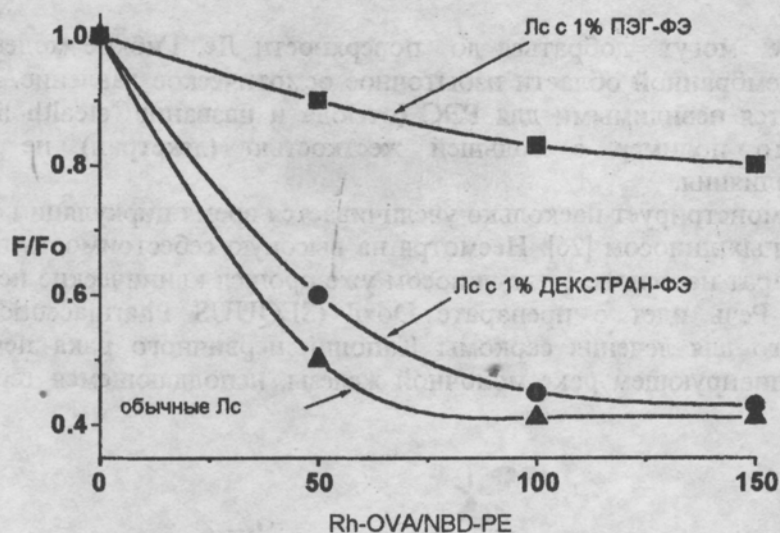


Рисунок 7.

Опсонины не могут добраться до поверхности стерически-стабилизированных липосом. Интенсивность тушения флуоресценции мембранного зонда (NBD-PE - флуоресцентно меченный фосфатидилэтаноламин) белком (Rh-OVA - меченый родамином овальбумин)

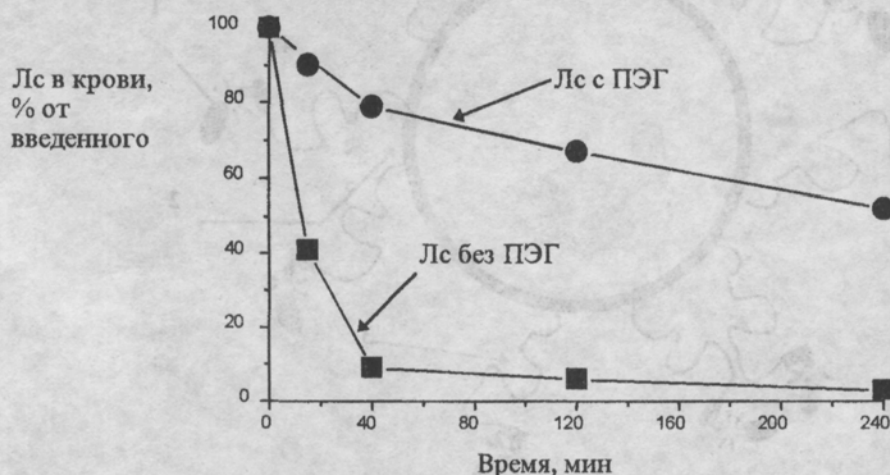


Рисунок 8.

Увеличение времени циркуляции липосом, модифицированных ПЭГ (Время циркуляции обычных и стерически стабилизированных липосом)

В случае использования липосомальных вакцин иммунный ответ усиливается в следствие того, что антигены, ассоциированные с липосомами попадают непосредственно в антигенпредставляющие клетки. На рис. 9 дается схема конструкции липосомальной вакцины против гепатита А [27]. В липосому включают кроме антигена (вирусный капсид) еще белки, способствующие слиянию мембран липосом и клеток, в данном случае гемагглютинин вируса гриппа. Для таких препаратов сейчас часто используют термин «виросомы». Виросома повторяет естественный путь вирусной частицы, в результате чего на поверхности антигенпредставляющей клетки оказывается экспонированным фрагмент антигена в составе с МНС-II, то есть в виде, который узнается Т-хелперами. В США заканчиваются клинические испытания нескольких оральных вакцин (против инфекции Шигеллы и патогенных *E. coli*). Липосомы представляют возможность просто конструировать поливалентные вакцины: например, против нескольких штаммов гриппа (сингапурский, Пекинский и Йамагата), гепатита А и В, дифтерии, столбняка. В Швейцарии одобрено несколько таких вакцин [1].

Важной областью применения липосом становится генная терапия. Липосомы как средство доставки генетического материала выступают и как

защита от нуклеаз, и в качестве компактизирующего средства (положительно заряженные липосомы), и как инициатор эндоцитоза. Известно, что важнейшим этапом процессинга вирусом является слияние ее мембраны с мембраной эндосомы, происходящее под действием гемагглютинаина. При этом содержимое липосомы попадает в цитозоль, то есть избегает лизосомальных ферментов. Именно этот путь считается предпочтительным для липосом, нагруженных генетическим материалом. Липосомы рассматриваются как наиболее перспективные носители. Некоторые композиции оказываются сравнимыми по эффективности трансфекции с аденовирусными векторами.

Во многих случаях, и для генной терапии не в последнюю очередь, важна адресная доставка в нужный тип клеток. В качестве «молекулярного адреса» наиболее часто выбирают иммуноглобулины, имеющие соответствующие мишени на целевых клетках.

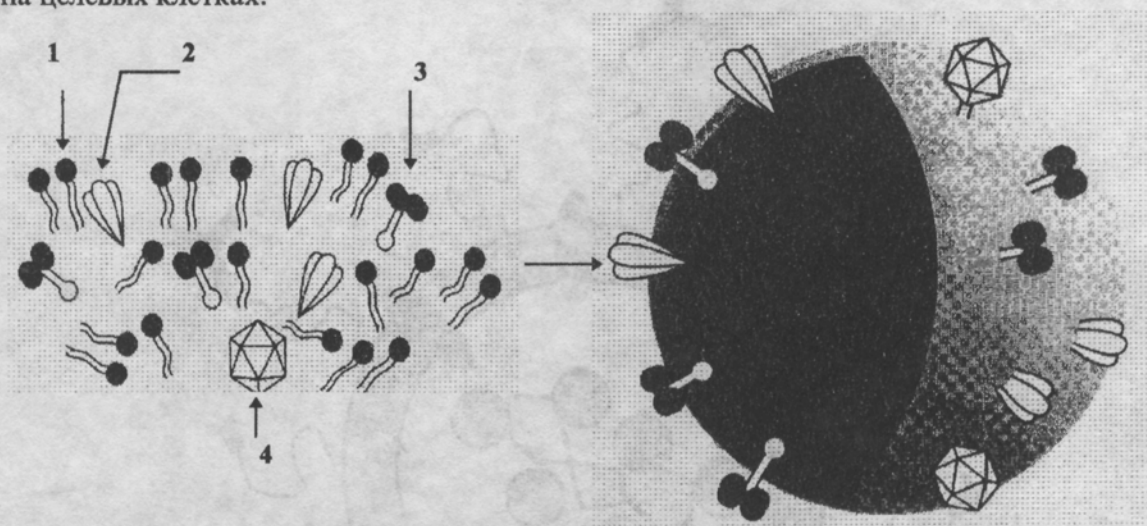


Рисунок 9.

Схема приготовления вирусом (вакцины на основе липосом). Вирусомы получают из смеси фосфолипидов (1), поверхностных белков вируса гриппа (гемагглютинаина (2) и нейраминидазы(3)) и антигена (4).

Таким образом, постепенно складывается модель «идеальной» липосомы, как средства направленной доставки лекарственного вещества в клетку (рис. 10). Такая липосома содержит во внутреннем объеме лекарственное вещество, например, ДНК в случае генной терапии, на ее поверхности иммобилизованы гибкие цепи полимера для уменьшения поглощения клетками РЭС, молекулярный адрес, в мембрану инкорпорированы белки слияния. Кроме того, мембрана состоит не только из обычных фосфолипидов, образующих бислой (чаще фосфатидилхолина), но и липидов способствующих слиянию с мембраной клетки (например, диолеилфосфатидилэтаноламина).

Липосомы могут быть весьма полезны для солубилизации веществ, плохо растворимых как в воде, так и в масле, например, таксола, бетулиновой кислоты. Так, нами получены липосомальные композиции, содержащие до 10 мольных процентов этого препарата, проявившего избирательное действие против меланомы [28].

Основной недостаток липосом как лекарственной формы - относительная небольшая стабильность при хранении. Этого недостатка лишены полимерные наночастицы, имеющие практически те же области возможного применения [29-31]. Но в отличие от липосом полимерные наночастицы состоят из менее безопасного материала, чем фосфолипиды. Этим в основном сдерживается их продвижение в качестве лекарственной формы.

Несколько особняком стоят нанокристаллы [32]. Такая форма очень полезна для увеличения биодоступности плохо растворимых лекарств [33, 34]. Биодоступность такого рода субстанций возрастает в несколько раз при переходе

от обычных порошков к нанокристаллам (наносуспензиям). Очень перспективным представляется использование в виде нанокристаллов рентгеноконтрастных веществ. Например, при коронарографии изображение сосудов сердца держится не более нескольких десятков секунд. Затем, вследствие выхода вещества из сосудистого русла, картина быстро теряет контрастность. Введение же нанокристаллических рентгеноконтрастных веществ позволяет наблюдать сосудистую систему в течении нескольких десятков минут.

В последние пять лет появилось более десятка лекарственных липосомальных препаратов, не меньшее количество находится на различных стадиях клинических испытаний. Это свидетельствует о том, что липосомальные исследования перешли на качественно другой уровень - уровень конструирования реальных препаратов.

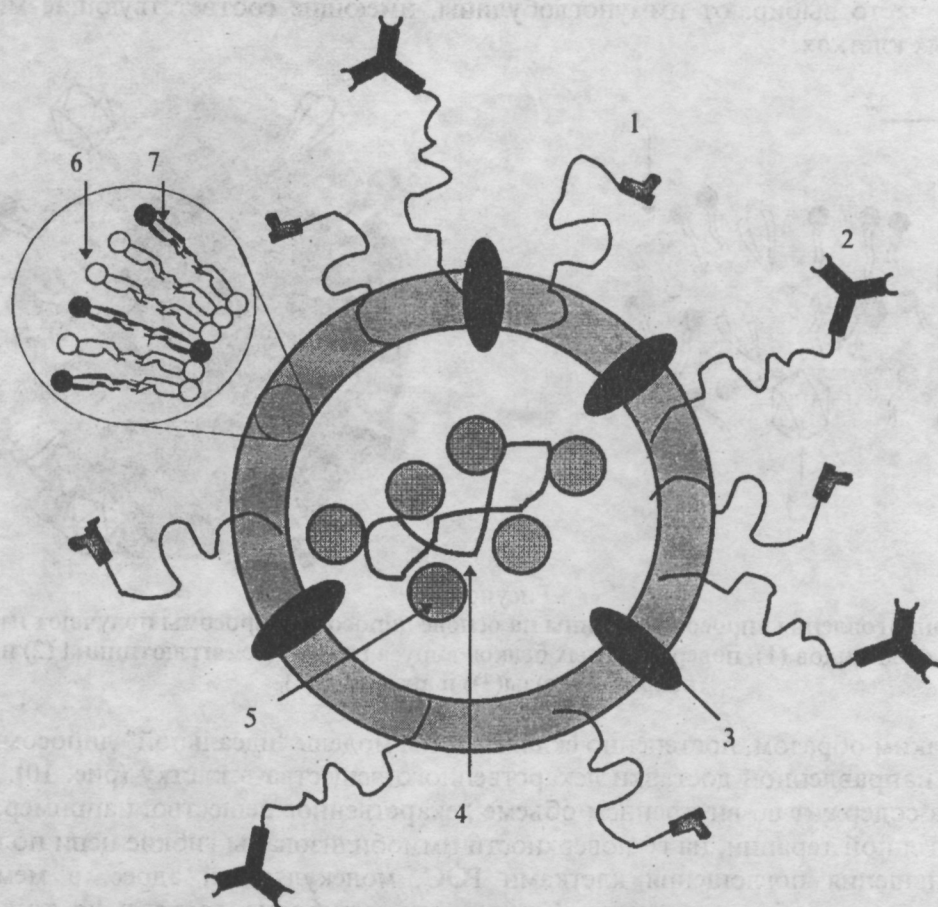


Рисунок 10.

“Идеальная” конструкция липосомы для направленной доставки лекарственного вещества в клетку; 1) Полимер для стерической защиты от РЭС (например, ПЭГ); 2) “Молекулярный адрес” на полимерной ножке (в основном иммуноглобулины); 3) Белки слияния (например, гематтлютинин); 4) Лекарственное вещество (например, ДНК); 5) Липидные положительно заряженные частицы для компактизации ДНК; 6) Мембранообразующие липиды (фосфатидилхолин); 7) Липиды, дестабилизирующие мембрану (например, ФЭ)

Для детального ознакомления с проблемой можно порекомендовать последние обзоры, касающиеся различных аспектов использования липосом в медицине: "Liposomes. Opportunities in drug delivery" [35], Liposomes as delivery agents for medical imaging [36], Affinity liposomes *in vivo*: factors influencing target accumulation [37], Enhanced anticancer therapy mediated by specialized liposomes [38], Long-term expression of the human α_1 -antitrypsin gene in mice employing anionic and cationic liposome vector [39], Невирусные методы переноса генов в генной терапии [40], Липосомы в генной терапии. Структурный полиморфизм липидов и эффективность доставки генетической информации [41], Gene therapy for central nervous system

injury: the use of cationic liposomes: an invited review [42], Liposomes for drug targeting in the lymphatic system [43], Liposomes and immunoassays [44], The role of immunoproteins in the survival of liposomes in the circulation [45], Gene transfer into the glomerulus by the hemagglutinating virus of Japan-liposome method [46], Novel strategy of gene therapy in cardiovascular disease with HVJ-liposome method [47], Liposomes: A drug carrier system for topical treatment in dermatology [48], Liposomes [49], Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery [50].

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Gregoriadis. G. (1995) TIBECH. 13, 527-537.
- 2 Yurasov V. V., Kucheryanu V. G., Kryzhanovsky G.N., et al. (1996) Progress in Drug Delivery Systems. Biomedical Research Foundation, Tokyo. Eds. Sadao Hirota, 5, 171-174.
- 3 Kucheryanu V. G., Yurasov V. V., Kryzhanovsky G. N., et al. (1996) Progress in Drug Delivery Systems. Biomedical Research Foundation, Tokyo, Eds. Sadao Hirota, 5, 179-182.
- 4 Юрасов В.В., Подгорный Г.Н., Кучеряну В.Г., и др. (1996) Бюллетень эксперим. биол. мед., 122, 614-617.
- 5 Юрасов В.В., Кучеряну В.Г., Кудрин В.С., и др. (1997) Бюллетень эксперим. биол. мед., 123, 150-153.
- 6 Maeda H., Matsumura Y. (1989) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 6, 193-210.
- 7 Seymour L. V. (1992) Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6, 135-187.
- 8 Jain R. K. (1987) Cancer Metastasis Rev. 6, 559-593.
- 9 Huang S.K., Mayhew E., Lasic D.D., et al. (1992) Cancer Res. 52, 6774-6781.
- 10 Дранов А.Л., Дудниченко А.С., Бутенко К.А., Краснополяский Ю.М. (1994) Вестн. фармации, №3-4, С. 88-92.
- 11 Дранов А.Л., Дудниченко А.С., Мезин И.А., и др. (1996) Бюлл. exper. биол. мед., № 8, 85-89.
- 12 Дудниченко А.С., Краснополяский Ю.М. (1996) Бюлл. exper. биол. 18, 125-129.
- 13 Дудниченко А.С., Краснополяский Ю.М. (1996) Бюлл. exper. биол. 18, 392-396.
- 14 Janoff A.S. (1992) Lab. Invest. 66, 655-658.
- 15 Gabizon A., Catane R., Uziely B., et al. (1994) Cancer Res. 54, 987-992.
- 16 Gill P.S., Espina B.M., Muggia F., et al. (1995) J. Clin. Oncol. 13, 996-1003.
- 17 Forssen E.A., Ross M.E. (1994) J. Liposomes Res. 4, 481-512.
- 18 Northfelt D.W., Kaplan L., Russell J., et al. (1995) in Stealth Liposomes (Lasic D.D., Martin F.J., eds). 257-266. CRC Press.
- 19 Bogner J. R., Goebel F.-D. (1995) in Stealth Liposomes (Lasic D.D., Martin F.J., eds). CRC Press. 267-278.
- 20 Blum G., Cevc G. (1990) Biochim. Biophys. Acta, 1029, 91-97.
- 21 Klivanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.V., Huang L. (1990) FEBS Letters., 268, 235-237.
- 22 Senior J., Delgado C., Fisher D., et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1062, 77-82.
- 23 Papahadjopoulou D., Allen T.M., Gabizon A., et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 11460-11464.
- 24 Allen T.M., Hansen C. (1991) Biochim. Biophys. Acta. 1068, 133-141.
- 25 Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Papisov M.I., et al. (1994) Biochim. Biophys. Acta, 1195, 11-20.

- 26 Torchilin V.P., Shtilman M.I., Trubetskoy V.S., et al. (1994) *Biochim Biophys Acta*, **1195**, 181-184.
- 27 Gluck R. (1995) In *Vaccine Design: The Submit and Adjuvant Approach* (Powell M.F., Newman M.J., eds.), Plenum Press. P. 325-345.
- 28 Le Bang Son, Kaplun A.P., Symon A.V., et al. (1998) *J. Liposome Research*. **8**, 78.
- 29 Torchilin V.P. (1998) *J. Microencapsul*, **15**, 1-19.
- 30 Muller R.H., Ruhl D., Runge S., et al. (1997) *Pharm. Res.* **14** 458-462.
- 31 Yuan F. (1998) *Semin. Radiat. Oncol.* **8**, 164-175.
- 32 Wiedmann T. S. DeCastro L. Wood R.W. (1997) *Pharm. Res.* **14**, 112-116.
- 33 Muller R.H., Peters K., Becker R., Kruss B. (1996) *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **22**, 574-575.
- 34 Bohm B.H.L., Grau M.J., Hildebrand G.E., et al. (1998) *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **25**, 956-957.
- 35 Allen T.M. (1997) *Drugs*, **54**, Suppl. 4, P. 8-14.
- 36 Torchilin V.P. (1996) *Mol. Med. Today*, **2**, 242-249.
- 37 Torchilin V.P. (1996) *J. Mol. Recognit.* **9**, 335-346.
- 38 Dass C.R., Walker T.L., Burton M.A., Decruz E.E. (1997) *J. Pharm. Pharmacol.* **49**, 972-975.
- 39 Alico S.F. (1997) *Biochem. Pharmacol.* **54**, 9-13.
- 40 Жданов Р. И. Куценко Н. Г. Федченко В. И. (1997) *Вопр. мед. химии* **43**, 3-12
- 41 Тараховский Ю.С., Иваницкий Р.Г. (1998) *Биохимия*. **63**, 723-736.
- 42 Yang K., Clifton G.L., Hayes R.L. (1997) *J. Neurotrauma*. **14**, 281-297.
- 43 Hirnle P. (1997) *Hybridoma*. **16**, 127-132.
- 44 Rongen H.A., Bult A., van Bennekom W.P. (1997) *J. Immunol. Methods*. **204**, 105-133.
- 45 Devine D.V., Marjan J.M. (1997) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **14**, 105-131.
- 46 Imai E., Isaka Y., Akagi Y., Kaneda Y. (1997) *Exp. Nephrol.* **5**, 112-117.
- 47 Morishita R., Higaki J., Aoki M., et al. (1996) *Contrib. Nephrol.* **118**, 254-264.
- 48 Schmid M.H., Korting H.C. (1994) *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Syst.*, **11**, 97-118.
- 49 Sharata H.H., Katz K.H. (1996) *Int. J. Dermatol.*, **35**, 761-769.
- 50 Cevc G., *Crit. Rev.* (1996) *Ther. Drug Carrier Syst.*, **13**, 257-388.

Поступила 30.09.1998 г.

LIPOSOMES AND OTHERS NANOPARTICLES AS THE DRUG DELIVERY SYSTEMS.

A. P. KAPLUN, LE BANG SON,
YU. M. KRASNOPOLSKY *, V. I. SHVETS

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow * "Biolek", Kharkov

The basic principles of designing of nanoparticle drug delivery systems are considered. The special attention is paid to liposomes, because the greatest success has been achieved in this area. The modern condition in such intensively developing areas as antitumor and, antibacterials drugs, gene therapy, vaccines is reviewed.

Key words: liposomes, nanoparticles, drug delivery systems, passive targeting, antitumor and antibacterials, gene therapy, vaccine.