

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Ле-Дейген Ирина Михайловна

**Разработка функционализированных липосомальных систем
для доставки лекарственных препаратов с использованием
разветвленных сополимеров на основе хитозана**

03.01.06 - БИОТЕХНОЛОГИЯ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – *Кудряшова Елена Вадимовна, доктор химических наук, доцент*

Официальные оппоненты – *Ямсков Игорь Александрович, профессор, доктор химических наук, Институт элементоорганических соединений Российской Академии наук им. А. Н. Несмеянова, заведующий лабораторией физиологически активных биополимеров.*

Марквичева Елена Арнольдовна, доктор химических наук, профессор, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, руководитель группы биомедицинских материалов.

Ефимова Анна Александровна, кандидат химических наук, кафедра высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, доцент.

Защита диссертации состоится «26» июня 2018 г. в 15:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва ул. Ленинские горы д. 1 стр. 11, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/86016386/>

Автореферат разослан «25» мая 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук

Саша

И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Как в России, так и в мире существует потребность в разработке новых, более эффективных и безопасных лекарств. Использование систем доставки биологически активных молекул с управляемыми свойствами позволяет решить ряд проблем, ограничивающих применение многих веществ. Среди основных проблем - низкая биодоступность и растворимость, выраженные побочные эффекты. Наиболее остро данная проблема проявляется в случае тяжелых хронических болезней, таких как злокачественные опухоли, туберкулёз и другие, когда требуется длительная медикаментозная терапия с применением высоких дозировок. Низкая эффективность систем доставки вынуждает принимать высокие дозы препаратов в течение многих месяцев и даже лет, что наносит значительный вред всему организму. При этом возрастает риск развития резистентности и множественной лекарственной устойчивости. Повышение экспозиции препаратов при тех же или меньших дозировках, а также обеспечение направленной доставки лекарств к очагам воспаления способны кардинально повысить эффективность и безопасность терапии широкого круга заболеваний.

Перспективной системой доставки представляются липосомы - липидные везикулы, сходные по химическому составу с мембраной живой клетки. Вариативность свойств липосомального контейнера, биосовместимость и биodeградируемость обуславливают широкое применение липосом в современной медицине. Структура липосом позволяет включать в них гидрофобные, гидрофильные и амфифильные соединения. Несмотря на значительный прогресс в области создания липосомальных контейнеров, лишь немногие лекарственные препараты были реализованы на практике. Основные ограничения в применении липосомальных систем - невысокая ёмкость контейнера, низкая эффективность захвата липосом целевыми клетками и неконтролируемое высвобождение лекарства. Поэтому актуальным является создание функционализированных липосомальных систем с целью придать системе требуемые свойства: в первую очередь, адресную доставку и увеличенное время циркуляции в кровотоке.

Биосовместимые полимеры, способные образовывать нековалентные комплексы с липосомами, - перспективные регуляторы свойств липосомальных систем. В связи с активным развитием подхода к модификации липосомальной поверхности за счет полимерной оболочки, актуальным является детальное изучение механизма комплексообразования, и выявление факторов, влияющих на структурно-функциональные свойства получаемых комплексов.

В настоящей работе предложен подход к получению липосомальных систем, функционализированных ПЭГ-хитозаном и конъюгатами хитозана с фолиевой кислотой, для доставки трех клинически важных препаратов различных классов: противоопухолевого препарата доксорубина, антибактериального препарата широкого спектра действия моксифлоксацина и иммуномодулятора рапамицина. Для доксорубина показана эффективность систем доставки на основе липосомальных систем, однако требуются дальнейшие исследования, направленные на создание стимул-чувствительных систем активного нацеливания. Остро стоит вопрос разработки систем доставки моксифлоксацина – одного из наиболее эффективных препаратов для лечения туберкулёза. Трудности в терапии моксифлоксацином заключаются в его малой растворимости в воде и невысокой биодоступности в очагах воспаления. Использование липосом может решить данные проблемы: высокое сродство липосом на основе фосфатидилхолина к легочному сурфактанту и возможность придания им мукоадгезивных свойств за счет покрытия производными хитозана может повысить биодоступность и обеспечить эффект пролонгированного действия препарата. Таким образом, функционализированные липосомальные системы особенно привлекательны для доставки моксифлоксацина. Рапамицин - крупная гидрофобная молекула, абсолютно нерастворимая в воде, поэтому включение его в липосомы может помочь значительно повысить эффективность терапии за счёт увеличения биодоступности.

Для глубокого изучения физико-химических свойств липосомальных форм лекарственных препаратов и их комплексов с полимерами предложен комплексный подход на

основе ИК-спектроскопии Фурье. Метод позволяет получать детальную информацию о тонкой структуре надмолекулярных систем и микроокружении функциональных групп. Анализ изменений положения и структуры полос поглощения в ИК-спектре позволяет определять характер взаимодействий функциональных групп с лигандами. Важным преимуществом метода является его применимость для анализа микрогетерогенных и гетерогенных коллоидных систем, таких как липосомальные комплексы, поскольку светорассеяние не оказывает влияние на оптические свойства системы в данной области электромагнитного излучения.

Цель исследования. Сформулированы две основные цели диссертационной работы. Во-первых, создание функционализированных липосомальных форм доксорубицина, моксифлоксацина и рапамицина с эффектом пролонгированного действия и активного нацеливания. Во-вторых, разработка метода диагностики состояния липидной мембраны при под действием внешних факторов, включении лекарственных субстанций, взаимодействии с полимерными лигандами на основе ИК-спектроскопии Фурье.

Для достижения поставленных целей в работе были определены следующие задачи:

1. разработка методов синтеза и характеристики производных хитозана различной архитектуры;
2. с целью разработки систем активного нацеливания осуществить синтез и характеристику производных хитозан-фолиевая кислота;
3. разработка метода изучения взаимодействия анионных липосом с поликатионами различной природы, в том числе с хитозаном и его производными на основе ИК-спектроскопии Фурье;
4. получение липосомальных форм моксифлоксацина, доксорубицина и рапамицина и изучение их физико-химических свойств;
5. исследование влияния структуры и состава полимерного покрытия на высвобождение содержимого из липосом;
6. определение цитостатической активности липосомальных форм доксорубицина и рапамицина на модельных клеточных системах A549, Caco2, MCF-7.

Научная новизна. В ходе выполнения данной работы впервые было проведено систематическое изучение взаимодействия липидной мембраны с низко- и высокомолекулярными веществами (лекарствами доксорубицином, моксифлоксацином и рапамицином и производными хитозана) методом ИК-спектроскопии Фурье. Предложен метод диагностики состояния липидной мембраны и определения физико-химических параметров комплексов липосом с полиэлектролитами (K_{dis} , стабильность, структурные характеристики). Показано, что разработанная автором методология позволяет получать детальную информацию о структуре комплекса липосом с полиэлектролитами различной природы, исследовать влияние свойств полимера на молекулярное состояние бислоя и роль каждой из функциональных групп липидных молекул в комплексообразовании; определять сайты связывания низко- и высокомолекулярных веществ с бислоем. Экспериментально установлены структуры липосомальных форм лекарственных препаратов. Установлено влияние молекулярной структуры производных хитозана на процесс высвобождения содержимого в различных условиях: увеличение содержания цепей ПЭГ в конъюгате ПЭГ-хитозан приводит к существенному замедлению высвобождения доксорубицина и моксифлоксацина. Разработаны стабилизированные pH-чувствительные липосомальные системы доставки доксорубицина и моксифлоксацина. Разработаны липосомальные формы доксорубицина и рапамицина с эффектом активного нацеливания по отношению к клеточным линиям с оверэкспрессией фолатных рецепторов, характеризующиеся выраженной цитотоксичностью.

Практическая значимость работы. Разработка систем доставки лекарственных средств с управляемыми свойствами остается актуальной задачей биомедицины и биотехнологии. В настоящей работе предложен подход к получению функционализированных липосомальных систем доставки трёх лекарственных препаратов: от синтеза полимеров до изучения свойств полученных систем *in vitro*. Было продемонстрировано, что регуляция свойств липосомальных систем возможно за счёт подбора молекулярной массы хитозана,

природы заместителя и степени модификации. Комплексообразование позволяет повысить стабильность при хранении, замедлить высвобождение содержимого, придать эффект активного нацеливания. Разработан метод тонкой диагностики липидных мембран, позволяющий в том числе определять основные сайты связывания с лигандами, рассчитывать константы диссоциации комплексов, определять положение активной молекулы в бислое. Результаты, полученные в настоящей работе, позволяют рассчитывать на дальнейший прогресс в развитии систем доставки лекарственных препаратов и открывают широкие перспективы разработки новых липосомальных форм биоактивных молекул с контролируемыми свойствами.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на следующих международных конгрессах, конференциях и школах: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2018, 2016, 2015, 2014 Москва, Россия), XI Конкурс проектов молодых ученых в рамках выставки Химия 2017 (Москва, Россия), Международный конгресс "Биотехнология: Состояние и перспективы развития" (2017, 2015, Москва, Россия), Modern Drug Discovery & Development Summit (M3D) 2015 (Филадельфия, США), International Conference "Biocatalysis: Fundamentals and Applications" (2017, 2015 Истра, Московская область), XI Международная конференция "Спектроскопия координационных соединений" (2014, Туапсе, Россия), International Conference INASCON (2014, Брозаарден, Дания).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 19 печатных работ: 8 статей, 10 тезисов докладов конференций и 1 патент на изобретение.

Структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, раздела постановки задачи, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 186 страницах и содержит 48 рисунков, 20 таблиц и 185 ссылок.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

В данной работе представлены результаты по созданию функционализированных липосомальных форм доксорубина, моксифлоксацина и рапамицина, в том числе с эффектом активного нацеливания. Для исследования структурных свойств комплексных липосомальных систем предложен метод диагностики состояния липидной мембраны при включении лекарственных субстанций и взаимодействия с полимерами на основе ИК-спектроскопии Фурье. Функционализацию поверхности липосом предложено осуществлять за счет комплексообразования с производными хитозана, биосовместимого полимера природного происхождения.

Синтез сополимеров ПЭГ-хитозан.

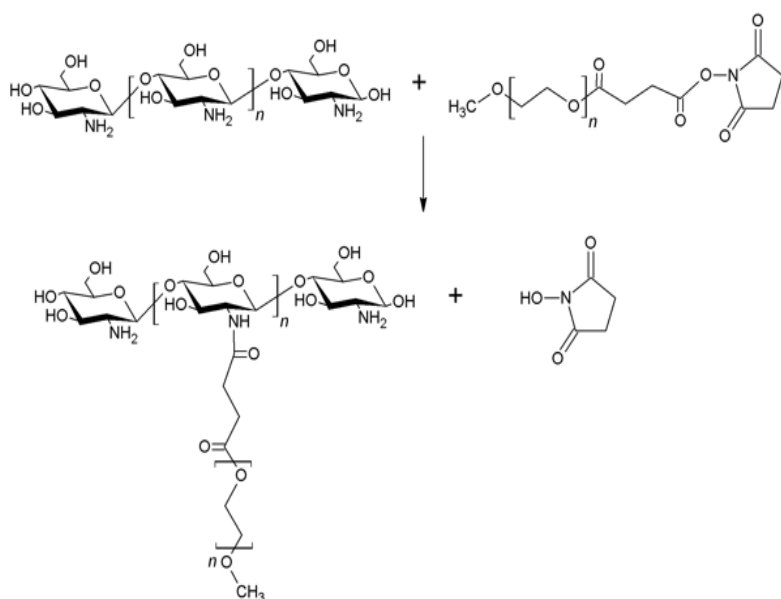


Рис. 1 Получение ПЭГ-хитозана по реакции с активированным производным mPEG-suc-NHS.

В работе получали производные хитозана молекулярной массы 5, 15 и 90 кДа по реакции, приведенной на рис. 1, с активированным производным ПЭГ монометокси-ПЭГ5000-N-гидроксисукцинимидилсукцинатом mPEG-suc-NHS.

ПЭГилирование позволяет придавать системам доставки лекарств требуемые свойства, в частности увеличивать время циркуляции в кровотоке. Следует ожидать существенную зависимость свойств ПЭГ-хитозана от степени модификации. В работе данную величину определяли по интенсивности полосы поглощения С-О-С связи 1089 см^{-1} в ИК-спектре ПЭГ-хитозана с учетом вклада

полисахаридного остова. В качестве контрольного метода использовали классический метод определения содержания свободных аминогрупп по реакции с тринитробензолсульфокислотой (ТНБС). Результаты определения степени модификации приведены в таблице 1. Установлено, что в зависимости от условий синтеза степень модификации варьировалась от 5 до 25%.

Таблица 1. Определение степени модификации ПЭГ-хитозана методом ИК-спектроскопии Фурье и спектрофотометрическим титрованием свободных аминогрупп TNBS (SD, n = 3). Все образцы имеют название по схеме ПЭГ-хитозан-М-Н, где М— молекулярная масса хитозана, кДа, N степ степень модификации, %, (по данным ИК-спектроскопии).

Образец	Хитозан, М кДа	ПЭГ /АГ*	Степень модификации % **				Число цепей ПЭГ на молекулу хитозана ***
			ИК- спектроскопия	SD, n=3	ТНБС титрование	SD, n=3	
ПЭГ-хитозан-90-5	90	2	5,0	0,5	4,0	1,0	12
ПЭГ-хитозан-90-14		4	14,0	0,2	11,0	1,9	33
ПЭГ-хитозан-90-15		5	15,0	0,5	13,0	2,8	36
ПЭГ-хитозан-90-18		6	18,0	0,5	17,0	2,3	43
ПЭГ-хитозан-90-25		10	25,0	0,9	25,0	1,9	60
ПЭГ-хитозан-15-20	15	3	20,0	0,9	19,0	3,3	8
ПЭГ-хитозан-15-22		5	22,0	0,5	22,0	2,3	9
ПЭГ-хитозан-5-15	5	3	15,0	0,4	13,5	1,6	2

* Мольный избыток mPEG-suc-NHS к свободным аминогруппам хитозана

** Где 0% - немодифицированный хитозан, 100% - полностью модифицированный хитозан (все свободные аминогруппы связаны с цепями ПЭГ)

*** Данные ИК-спектроскопии Фурье

Стабильность синтезированных сополимеров ПЭГ-хитозан по отношению к гидролизу амидной связи оценивали в независимом эксперименте при хранении растворов полимеров (0,02 М натрий-фосфатный буферный раствор, pH 7,4) при температуре 4° С и -20° С в течение 24 месяцев. Регулярно отбирали пробы раствора, свободные цепи ПЭГ отделяли ультрафильтрацией, после чего их содержание определяли методом ИК-спектроскопии Фурье. Установлено, что хранение растворов производных хитозана при положительной температуре ограничено 2 месяцами, при температуре -20° С полимеры оставались стабильны не менее 24 месяцев. Полученные результаты указывают на то, что ПЭГ-хитозан представляет собой перспективный полимер, легкий в получении и очистке, стабильный на протяжении не менее 24 месяцев, что определяет применимость данных конъюгатов в биомедицине.

Синтез конъюгатов хитозан-фолиевая кислота.

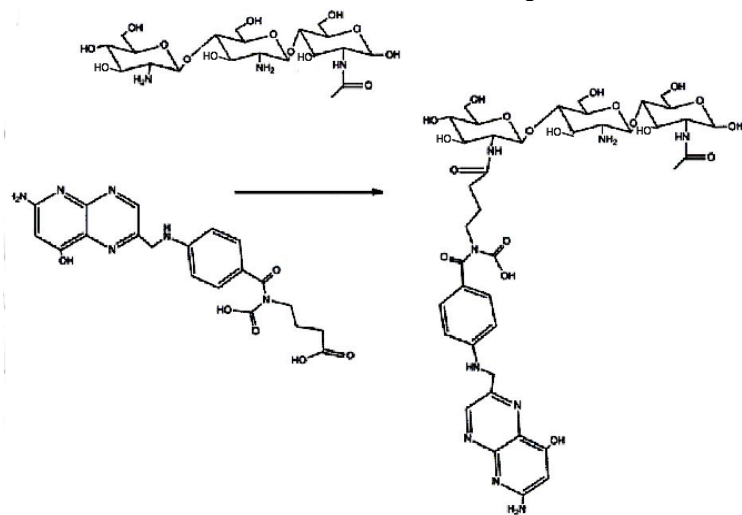


Рис. 2. Синтез конъюгатов хитозан-фолиевая кислота с предварительной активацией карбоксильной группы фолиевой кислоты 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом.

Для придания липосомальным системам эффекта активного нацеливания в работе получали конъюгаты хитозана с фолиевой кислотой по реакции с предварительной активацией карбоксильной группы 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (рис. 2). Выбор фолатной адресной метки обусловлен гиперэкспрессией на поверхности многих опухолевых клеток соответствующего рецептора. Степень модификации синтезированных конъюгатов определяли по полосе поглощения фолиевой кислоты в УФ-спектре 217 нм с контролем по полосе поглощения 253 нм и по методу титрования свободных аминогрупп ТНБС

(результаты представлены в таблице 2).

Таблица 2. Определение степени модификации конъюгатов хитозана с фолиевой кислотой (SD, n = 3). Все образцы имеют название по схеме ФК-хитозан-М-Н, где М— молекулярная масса хитозана, кДа, Н степень модификации, %.

Образец	Хитозан, М кДа	ФК/АГ*	Степень модификации % **				Число остатков фолиевой кислоты на молекулу хитозана ***
			УФ по А217 нм	SD, n=3	ТНБС анализ	SD, n=3	
ФК-Хитозан90-2	90	0,5	2,2	0,4	3,0	1,5	5
ФК-Хитозан90-19		5	19,1	0,5	18,5	1,6	48
ФК-Хитозан15-20	15	5	15,3	0,7	13,6	1,8	6
ФК-Хитозан5-20	5	5	20,2	0,2	17,8	2,5	3

* Мольный избыток фолиевой кислоты к свободным аминогруппам хитозана

** Где 0% - немодифицированный хитозан, 100% - полностью модифицированный хитозан (все свободные аминогруппы связаны с остатками фолиевой кислоты)

*** По данным УФ-спектроскопии (А 217 нм)

Следует отметить, что результаты определения степени модификации, полученные методами УФ-спектрофотометрии и титрованием свободных аминогрупп ТНБС, хорошо согласуются между собой.

Разработка метода анализа свойств липосом и их комплексов на основе ИК-спектроскопии Фурье.

Для выяснения механизма комплексообразования липосом с производными хитозана и определения физико-химических параметров комплексов в работе исследованы возможности метода ИК-спектроскопии Фурье в режиме НПВО, который позволяет получать детальную информацию о тонкой структуре надмолекулярных систем, сайтах взаимодействия

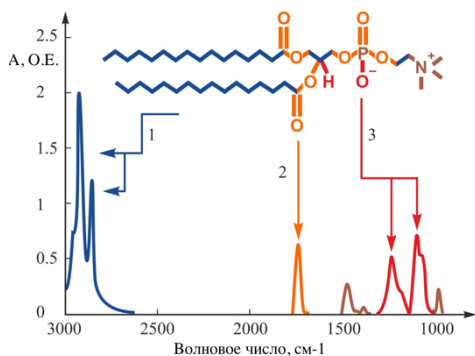


Рис. 3. Нормализованный ИК-спектр липосом ДПФХ:КЛ (80:20 в весовом отношении) в 0.01М боратном буфере, pH 9,2. Стрелками показано соотнесение характеристических полос поглощения основных функциональных групп липидов (ацильные цепи (1), карбонильная (2) и фосфатная группы (3))

макромолекул с лигандами, микроокружении функциональных групп. В качестве объекта исследования были выбраны анионные липосомы, содержащие 80% дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и 20% кардиолипина (КЛ).

Анионные липосомы ДПФХ:КЛ находятся в гелеобразном состоянии при комнатной температуре (ИК-спектр приведен на рис.3). Две наиболее интенсивные полосы поглощения соответствуют асимметричным (2920 см^{-1}) и симметричным (2850 см^{-1}) валентным колебаниям CH_2 - групп. Положение данных полос поглощения зависит от характера упаковки гидрофобных цепей в бислое. Полоса поглощения карбонильных групп ($1715 - 1745\text{ см}^{-1}$) чувствительна к изменениям микроокружения на границе липид-вода, в то время как полоса поглощения асимметричных валентных колебаний фосфатной группы ($1220 -$

1260 см^{-1}) является сенсором взаимодействия с катионными лигандами.

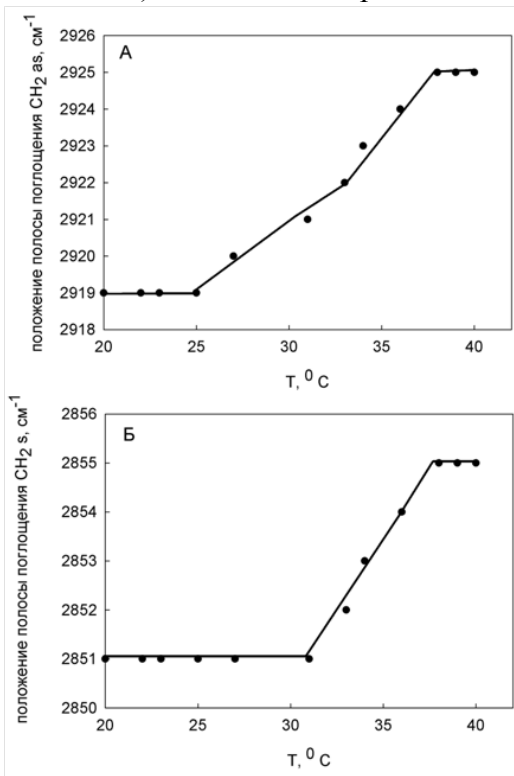


Рис. 4. Кривая зависимости волнового числа (А) асимметричных (Б) симметричных колебаний CH_2 групп от температуры в липосомах ДПФХ:КЛ (80:20 в весовом отношении) в 0,01 М боратном буферном растворе, pH 9,2. Ошибка определения положения максимума не превышает $0,1\text{ см}^{-1}$.

нагревании липидный бислой разрушается, и $\text{C}=\text{O}$ группы, находящиеся на границе раздела фаз липид-вода, становятся более доступными для молекул воды.

Таким образом, при фазовом переходе наблюдаются следующие эффекты: в гидрофобной области - высокочастотный сдвиг полос поглощения ацильных цепей, что свидетельствует о росте подвижности гидрофобных цепей и повышении

Одним из наиболее важных параметров, влияющим на свойства липосом как контейнера для доставки лекарств, является фазовое состояние. Метод ИК спектроскопии был применен для исследования фазовых переходов в липосомах ДПФХ:КЛ 80:20 и влияния полимерных лигандов на фазовый переход. Термограммы регистрировали в интервале температур $22 - 45\text{ }^\circ\text{C}$ как зависимости положения характеристических полос поглощения карбонильной группы, а также симметричных и асимметричных колебаний CH_2 - групп от температуры (рис.4)

Обнаружено, что полосы поглощения ацильных цепей претерпевают высокочастотные сдвиги, в то время как полоса карбонильной группы смещается в область меньших волновых чисел. Известно, что смещение полос поглощения $\nu\text{CH}_2\text{as}$ и $\nu\text{CH}_2\text{s}$ в область больших волновых чисел связано с большей подвижностью гидрофобных цепей в бислое.

Термограмма для полосы поглощения $\text{C}=\text{O}$ группы представлена на рис. 5. Низкочастотный сдвиг при нагревании

свидетельствует о повышении степени гидратации карбонильных групп. При

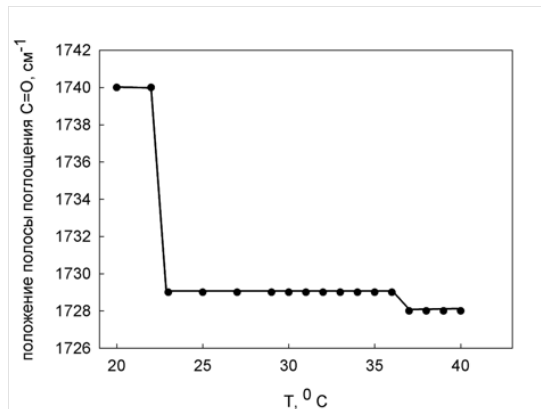


Рис. 5. Кривая зависимости волнового числа колебаний $\text{C}=\text{O}$ от температуры в липосомах ДПФХ:КЛ (80:20 в весовом отношении) в 0,01 М боратном буферной растворе, pH 9,2. Ошибка определения положения максимума не превышает $0,1\text{ см}^{-1}$.

текучести мембраны; в области раздела фаз липид-вода - низкочастотный сдвиг полосы поглощения карбонильной группы, что свидетельствует о повышении степени гидратации при увеличении подвижности в бислое.

Показано, что метод ИК-спектроскопии чувствителен к изменениям, происходящим в липосомальной мембране и позволяет следить за фазовым переходом в бислое. Данный метод был применен далее для исследования характера влияния полимерных лигандов на состояние липидного бислоя.

Для установления механизма взаимодействия липосом с лигандом принципиальным является определение сайтов связывания. В работе была выбрана модельная система, уже хорошо описанная в литературе, - комплексы нейтральных (100% ДПФХ) и анионных липосом ДПФХ:КЛ (80:20) с синтетическим полимером поли-N-этил-4-винил-пиридиний бромидом (ПЭВП) со степенью алкилирования 0,9-0,95. По-видимому, фазовое состояние мембраны должно оказывать влияние на взаимодействие с лигандом. Результаты, приведенные в таблице 3, отображают изменения в ИК-спектре ЖК-липосом при образовании комплекса с ПЭВП.

Таблица 3. Частоты характеристических полос поглощения в ИК-спектрах ЖК-липосом (ДПФХ 100%) в комплексе с синтетическим поликатионом ПЭВП в осново-мольном соотношении 1:1 в сравнении со свободными липосомами. 0,01 М боратный буферный раствор, рН 9,2, 22°C.

Колебания связей	Липосомы, см ⁻¹	Липосомы- ПЭВП см ⁻¹	Интерпретация
$\nu_s \text{CH}_2$	2853	2853	ПЭВП не взаимодействует с гидрофобной частью
$\nu_{as} \text{CH}_2$	2924	2924	
$\nu_{as} \text{PO}_2^-$	1228	1230	Снижение степени гидратации; Уменьшение числа Н-связей
$\nu \text{C=O}$	1732	1741	

Сохранение положения полос поглощения ацильных цепей свидетельствует об отсутствии взаимодействия между поликатионом и гидрофобной частью бислоя. Высокочастотные сдвиги полос поглощения фосфатной и карбонильной групп, связанные со снижением степени гидратации, свидетельствуют о разрыве водородных связей при взаимодействии с поликатионом за счет образования электростатических связей между анионными группами липидов и лигандом.

Иная картина наблюдалась при взаимодействии поликатиона с гелеобразными липосомами (таблица 4). Наблюдались существенные сдвиги полос поглощения ацильных цепей в область меньших волновых чисел, что указывает на снижение подвижности гидрофобных остатков жирных кислот. При этом наблюдался высокочастотный сдвиг полос поглощения фосфатной и карбонильной группы, указывающий на образование связей с поликатионом. Наблюдаемые спектральные изменения можно объяснить взаимодействием поверхности липосом с поликатионом и частичным замораживанием степеней свободы в гидрофобной части липидного бислоя.

Таблица 4. Частоты характеристических полос поглощения в ИК-спектрах гелеобразных липосом ДПФХ:КЛ (80:20 по весу) в комплексе с синтетическим поликатионом ПЭВП в сравнении со свободными липосомами. 0,01 М боратный буферный раствор, рН 9,2, 22°C.

Колебания связей	Липосомы, см ⁻¹	Липосомы+ПЭВП, см ⁻¹	Интерпретация
$\nu_s \text{CH}_2$	2851-2853	2850	Уменьшение подвижности гидрофобных цепей
$\nu_{as} \text{CH}_2$	2918-2919	2917	
$\nu_{as} \text{PO}_2$	1220	1223	Снижение степени гидратации; Уменьшение числа Н-связей
$\nu \text{C=O}$	1737	1739	

Таким образом, методом ИК-спектроскопии было установлено, что фазовое состояние липосом оказывает решающее влияние на структуру комплекса с поликатионом. С другой стороны, исходя из анализа сдвига полос поглощения, можно судить о характере взаимодействия бислоя с лигандами. Данные ИК-спектроскопии согласуются с

литературными данными, что указывает на возможность применения данного метода для анализа тонкой структуры липосом и их комплексов.

Изучение взаимодействия липосом с производными хитозана

При комплексообразовании гелеобразных липосом ДПФХ:КЛ (80:20) с сополимерами ПЭГ-хитозана в ИК-спектре липосом наблюдали ряд характерных изменений, общих для всех образцов (таблица 5). Полосы поглощения фосфатной и карбонильной группы претерпевают высокочастотный сдвиг, указывающий на образование электростатических связей между фосфатными группами липидов на поверхности липосом с аминогруппами хитозана. При этом следует отметить, что сдвиги полосы поглощения $\nu_{PO_2^-}$ в случае комплексов липосом с производными высокомолекулярного хитозана более выражены по сравнению с производными хитозана ММ 5 и 15 кДа. По-видимому, это связано с возможностью более крупных полимерных молекул вызывать латеральную сегрегацию молекул кардиолипина в поверхностном слое гелеобразных липосом. Более того, для комплексов липосом с производными хитозана 90кДа в ИК-спектре обнаруживается низкочастотный сдвиг полос поглощения ацильных цепей, указывающий на снижение подвижности гидрофобных хвостов. Подобный эффект ранее был обнаружен при взаимодействии анионных липосом с поли-N-этил-4-винилпиридиний бромидом. Таким образом, производные низкомолекулярного хитозана (5 и 15 кДа) взаимодействуют исключительно с поверхностью липосом, в то время как производные высокомолекулярного хитозана (90кДа) оказывают влияние и на гидрофобную часть бислоя.

Таблица 5. Частоты характеристических полос поглощения в ИК-спектрах и средний гидродинамический радиус липосом ДПФХ:КЛ (80:20 по весу) в комплексе производными хитозана в сравнении со свободными липосомами.

Образец	Частоты колебаний групп, см ⁻¹				R, нм	Интерпретация
	CH ₂ as	CH ₂ s	C=O	PO ₂ ⁻ as		
Липосомы	2920	2851	1739 1723 (плечо)	1225	103	Гелеобразное состояние
Липосомы – хитозан 90кДа	2919	2850	1730 1742 (плечо) 1726 (плечо)	1244	118	
Липосомы - ПЭГ-хитозан-90-5	2919	2850	1731	1240	120	Эффективное взаимодействие с анионными группами, снижение подвижности гидрофобной части бислоя
Липосомы - ПЭГ-хитозан-90-14	2918	2850	1740	1245 1220 (плечо)	118	
Липосомы - ПЭГ-хитозан-90-15	2918	2851	1742	1245 1222 (плечо)	120	
Липосомы - ПЭГ-хитозан-90-18	2918	2849	1741	1244, 1263	120	
Липосомы - ПЭГ-хитозан-90-25	2917	2849	1744	1244, 1263	123	
Липосомы – хитозан-15	2920	2851	1743	1230	117	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-15-20	2920	2850	1744 1720 (плечо)	1244	119	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-15-22	2920	2850	1744	1243	117	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-15-5	2920	2850	1741	1232	119	
Липосомы – ПЭГ-хитозан-5-15	2920	2850	1743 1723 (плечо)	1240	119	

Для использования нековалентных комплексов липосом в биомедицинских цепях предпочтительны величины констант диссоциации порядка 10^{-6} М и менее, в противном случае *in vivo* комплекс будет распадаться. Определение констант диссоциации липосомальных комплексов представляется нетривиальной задачей. Более того, необходимо определить состав комплекса, т.е. иметь возможность оценить число молекул полимера, связанных с одной липосомой. В данной работе предложен оригинальный метод определения цепей ПЭГ в нековалентном комплексе ПЭГ-хитозан – липосомы на основе ИК-спектроскопии Фурье.

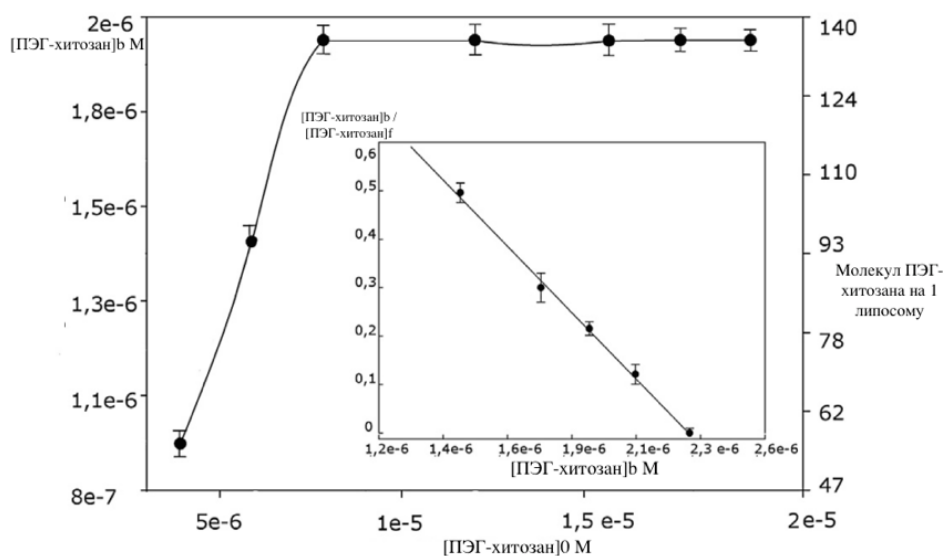


Рис. 6. Изотерма сорбции ПЭГ-хитозан90-25 на анионных липосомах ДПФХ:КЛ (80:20) в 0,01 М боратном буферном растворе pH 9,2 (SD, n = 3). На вставке: линейаризация изотермы в координатах Скетчарда.

Суть метода заключается в разделении комплекса липосом и несвязавшегося полимера центрифугированием и определении концентрации звеньев ПЭГ в комплексе (осадке) и в супернатанте. Определяя количество свободного ПЭГ-хитозана в зависимости от добавленного в систему, определяли константу диссоциации

комплекса, что позволяет подобрать оптимальное соотношение компонентов системы.

Получены комплексы липосомы : ПЭГ-хитозан90-25 в осново-мольном соотношении от 1:0,25 до 1:10. Определяли количество связанного в комплекс полимера $[(\text{ПЭГ-хитозан})_b]$ и свободного $[(\text{ПЭГ-хитозан})_f]$ в системе для каждого осново-мольного соотношения. Из анализа изотермы сорбции ПЭГ-хитозана (рис. 6) следует, что количество связанного в комплекс полимера увеличивается с увеличением общего количества полимера в системе с выходом на плато в точке 1:7, соответствующей полному насыщению (стехиометрический состав комплекса 1:1,2). Линейаризация изотермы сорбции в координатах Скетчарда позволила рассчитать константу диссоциации комплекса $1,5 \cdot 10^{-6}$ М, что хорошо согласуется с литературными данными о взаимодействии липосом с некоторыми другими поликатионными лигандами. Определен стехиометрический состав комплекса $1:1,2 \pm 0,3$ осново-моль.

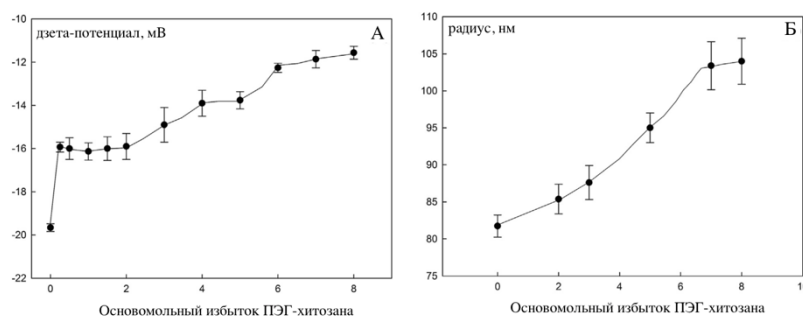


Рис. 7. Зависимость А. ζ -потенциала (SD, n = 3). Б. радиуса везикул (SD, n = 3) от осново-мольного избытка ПЭГ-хитозан90-25. 0,01 М боратный буферный раствор pH 9,2.

Комплексообразование в условиях насыщения (по полимеру) сопровождается увеличением гидродинамического радиуса везикул и нейтрализацией ζ -потенциала, о чем свидетельствуют данные динамического светорассеяния (рис. 7) и анализа траектории наночастиц. Увеличение осново-мольного избытка полимера приводит к большему радиусу частицы и увеличению

ζ -потенциала, что указывает на образование комплекса.

Важной характеристикой комплекса является число молекул полимера, адсорбированных на одной липосоме. Для определения данного параметра предложен метод, основанный на анализе данных метода анализа траектории наночастиц, который позволяет определять концентрацию везикул в растворе. При общей концентрации липидов 3 мг/мл число везикул составляет 1×10^{16} частиц/мл, молярная концентрация полимера в комплексе $2,3 \times 10^{-6}$ М (рис. 6), что означает, что в условиях насыщения на одну везикулу сорбируется примерно 135 молекул полимера (рис. 6 правая ось).

Таким образом, для компенсации зарядов на поверхности липосом необходим семикратный осново-мольный избыток полимера. Данный факт можно объяснить, учитывая, что хитозан – достаточно жесткий полимер, не способный плотно покрыть поверхность липосомы, и многие аминогруппы в его структуре малодоступны для взаимодействия.

Выше было высказано предположение, что основными сайтами связывания полимера на липосомах являются карбонильные и фосфатные группы, которые способны электростатически взаимодействовать с аминогруппами ПЭГ-хитозана. Нельзя также исключать вклад иных взаимодействий в данное взаимодействие.

Если основной вклад вносят электростатические взаимодействия, то данные комплексы будут неустойчивы при увеличении ионной силы. Напротив, если основную роль играет адсорбция, можно полагать, что комплексы будут стабильны и в растворах с высокой ионной силой. Для выяснения роли электростатического взаимодействия методом ИК-спектроскопии было изучено, как изменяется состояние функциональных групп липидов, ответственных за электростатические взаимодействия с аминополисахаридами, в растворах с высокой ионной силой.

Таблица 6. Положение полос поглощения νPO_2^- , $\nu\text{C}=\text{O}$, νCH_2 as, νCH_2 s в свободных липосомах ДПФХ:КЛ (80:20) и в липосомах в комплексе с ПЭГ-хитозаном-25 при высокой и низкой ионной силе ($I=0,2$ и $I=0,05$).

Функциональная группа	Липосомы	Липосомы-ПЭГ-хитозан-25	
	$I=0,03$	$I=0,2$	$I=0,03$
C=O	1739	1739	1744
PO_2^-	1225	1224	1263
CH_2 as	2920	2919	2917

Было установлено, что в присутствии хитозана и ПЭГ-хитозана-25 при высокой ионной силе ($I=0,2$ М) полосы поглощения νPO_2^- , $\nu\text{C}=\text{O}$, νCH_2 - as в липосомах не претерпели никаких изменений по сравнению с исходным состоянием липосом (таблица 6). Таким образом, в условиях ослабленного электростатического взаимодействия ($I=0,2$ М) комплексы липосом с ПЭГ-хитозан90-25 не образуются, что указывает на преимущественно электростатический характер взаимодействия.

Влияние комплексообразования с ПЭГ-хитозаном на стабильность липосом.

Липосомы недостаточно стабильны при хранении, склонны к образованию дефектов в бислое, к агрегации и окислению, что ограничивает их применение в медицине в качестве носителя для доставки лекарственных средств. Мы предположили, что применение ПЭГ-хитозана может существенно повысить стабильность липосом при хранении и предотвратить их агрегацию за счет электростатического отталкивания полимерных цепей связанного с липосомами полиэлектролита. В качестве критерия стабильности в работе предложено использовать положение полосы поглощения νCH_2 as как «сенсор» состояния гидрофобной части бислоя, и положение полосы поглощения $\nu\text{C}=\text{O}$, чувствительной к нарушению структурной целостности липосом. Известно, что данные полосы весьма чувствительны также к состоянию агрегации и окислению липосом. В качестве предельного агрегированного состояния липосом нами были использованы липосомы, хранившиеся в течение 6 месяцев при охлаждении (4°C).

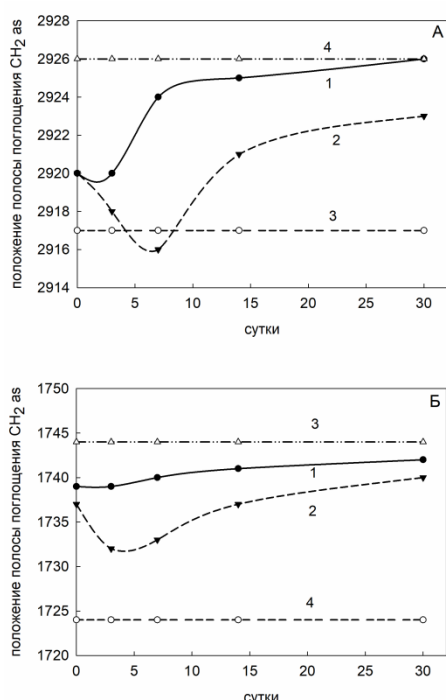


Рис. 6. Смещение полос поглощения $\nu\text{CH}_2\text{as}$ (А) и $\nu\text{C}=\text{O}$ -групп (Б) при хранении свободных липосом (1), липосом в комплексе с хитозаном (2) и в комплексе с ПЭГ-хитозаном-25 (3) в 0,01 М боратном буферном растворе pH 9,2 при 4° С. Положение соответствующих полос поглощения для свободных липосом в агрегированном состоянии

Найдено, что при длительном хранении липосом полоса поглощения $\nu\text{CH}_2\text{as}$ претерпевает существенные изменения: наблюдается сдвиг с 2920 см^{-1} к 2926 см^{-1} , что свидетельствует об агрегации и разрушении структуры липидных мембран (рис. 8). Из рис. 38 следует, что при хранении свободных липосом серьезные изменения в структуре бислоя наблюдаются через 10-14 суток. За это время положение полосы поглощения ацильных групп достигает 2925 см^{-1} и приближается к состоянию, характерному для агрегированных липосом (рис. 8А, график 4). Наибольшую стабильность продемонстрировал препарат комплекса липосом с ПЭГ-хитозаном. В этом случае положение полосы поглощения νCH_2 -групп оставалось неизменным в течение как минимум 1 месяца хранения, что указывает на образование равновесного комплекса и его стабильность при дальнейшем хранении.

Любопытными представляются данные о смещении полосы поглощения связи $\text{C}=\text{O}$ в липосомах при хранении изучаемых образцов (рис. 8Б). В случае свободных липосом полоса поглощения $\text{C}=\text{O}$ -групп претерпевает плавный сдвиг в область больших волновых чисел в течение 3-5 дней, что свидетельствует о понижении степени гидратации данной группы. Наиболее вероятно, что это связано с образованием дефектов, слипанием липосом и агрегации при хранении. Напротив, в случае комплекса липосом с ПЭГ-хитозан-90-25 положение полосы поглощения карбонильной группы оставалось неизменным, что в совокупности с

неизменностью состояния CH_2 групп в бислое, указывает на образование квазиравновесного комплекса липосом с ПЭГ-хитозаном и его структурную стабильность при хранении как минимум в течение 30 дней.

Взаимодействие липосом с конъюгатом хитозан-фолиевая кислота.

За взаимодействием липосомальной мембраны с конъюгатами хитозан-ФК также следили при помощи метода ИК-спектроскопии Фурье с контролем размера частиц методом динамического светорассеяния. Было выбрано осново-мольное соотношение 1:7 для сравнения результатов с результатами по комплексам липосом с ПЭГ-хитозаном.

Положение основных полос поглощения и гидродинамический радиус частиц приведен в таблице 7.

Таблица 7. Положение основных полос поглощения в ИК-спектре и гидродинамический радиус комплексов липосом с конъюгатами ФК-хитозан.

Образец	$\nu\text{CH}_2\text{as}$, см^{-1}	$\nu\text{CH}_2\text{s}$, см^{-1}	νCO , см^{-1}	$\nu\text{PO}_2\text{as}$, см^{-1}	R, нм	Интерпретация
Липосомы	2920	2851	1739 1723 (плечо)	1225	103	Гелеобразное состояние
Липосомы + ФК-Хитозан90-2	2920	2851	1735	1226	116	Взаимодействие полимера с фосфатными и карбонильными группами на поверхности липосом
Липосомы + ФК-Хитозан90-19	2920	2851	1735	1228 1260 (плечо)	117	
Липосомы + ФК-Хитозан15-20	2920	2851	1736	1227	110	
Липосомы + ФК-Хитозан15-2	2920	2851	1735	1226	114	

Изменения, наблюдаемые в ИК-спектре липосом в присутствии всех исследуемых производных хитозана, единообразны. Высокочастотные сдвиги полос поглощения карбонильных и фосфатных групп в совокупности с увеличением гидродинамического радиуса везикул указывает на образование электростатического комплекса с аминогруппами хитозана.

Интересно, что толщина полимерной шубы для комплексов липосом с ФК-хитозаном незначительно меньше, чем для комплексов с ПЭГ-хитозаном. По-видимому, это связано с тем, что окруженные гидратной оболочкой цепи ПЭГ «невидимы» для метода динамического светорассеяния, т.о. радиус около 120 нм соответствует «плотному» комплексу, цепи и петли полимера, несвязанные с липосомой напрямую формируют дополнительную «рыхлую» оболочку.

Получение липосом, загруженных лекарствами.

В работе получали липосомальные формы трех лекарственных препаратов различной природы: противоопухолевого препарата доксорубина, антибиотика моксифлоксацина, иммуномодулятора рапамицина. Их структуры приведены на рис. 9.



Рис. 7. Химическое строение доксорубина, моксифлоксацина и рапамицина.

Доксорубин и моксифлоксацин растворимы в воде, однако их биодоступность в целевых тканях невысока, что обуславливает необходимость разработки систем доставки. С другой стороны, растворимость рапамицина в воде ничтожно

мала, это крупная гидрофобная молекула. В работе было изучено влияние строения лекарственной молекулы на структурно-функциональные свойства её липосомальной формы.

Липосомы, загруженные доксорубином (ЛДокс), были получены методом активной (градиент рН) и пассивной загрузки. Эффективность загрузки определяли по флуоресценции доксорубина во внешнем растворе диализа и в пробе липосом разрушенных детергентом Triton X-100. Результаты определения эффективности загрузки приведены в таблице 8.

Таблица 8. Липосомальные формы доксорубина (ЛДокс): эффективность загрузки (%), положение основных полос поглощения в ИК-спектре, гидродинамический диаметр по данным динамического светорассеяния и ζ-потенциал.

Способ загрузки	Эф-ность загрузки, %	ν_{CH_2} as, cm^{-1}	ν_{CH_2} s, cm^{-1}	ν_{CO} , cm^{-1}	ν_{PO_2} as, cm^{-1}	d, нм	ζ-потенциал, мВ
Контроль ("пустые липосомы")		2920	2851	1739 1723 (плечо)	1225	100±2 (PDI 0,154)	-20,10±0,05
Пассивная загрузка	32±5	2920	2851	1735	1226	101±2 (PDI 0,169)	-20,03±0,05
Активная загрузка (Градиент рН)	96±4	2920	2851	1735	1228 (62%) 1245 (34%) 1266 (4%)	103±2 (PDI 0,185)	-20,12±0,05

Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными. Действительно, эффективность пассивной загрузки обычно не превышает 60%, в то время как некоторые методы активной загрузки позволяют достичь почти 100% эффективности. Для определения локализации доксорубина в мембране и о выявлении различий в структуре загруженных липосом, полученных разными методами предложено использовать метод ИК-спектроскопии Фурье.

В таблице 8 даны положения основных полос поглощения в спектре липосом. Обращает на себя внимание консервативность положения полос CH_2 групп, что указывает на

отсутствие значимого взаимодействия доксорубицина с гидрофобной частью бислоя. В то же время в области поглощения карбонильной и фосфатной группы наблюдаются сдвиги, характерные для образования водородных связей, причем эти сдвиги более выражены для липосом, полученных методом активной загрузки.

Для получения более детальной информации о состоянии фосфатных групп был использован метод деконволюции соответствующей полосы поглощения. Если для ЛДокс, полученного методом пассивной загрузки, полоса поглощения νPO_2 описывается одной компонентой 1226 см^{-1} , то для ЛДокс, полученного методом активной загрузки, выделяются несколько основных компонент: 1228 см^{-1} , 1245 см^{-1} и 1266 см^{-1} с интегральными долями 62%, 34% и 4% соответственно.

Таким образом, из анализа данных ИК спектроскопии следует, что доксорубицин расположен во внутренней полости липосом. Для подтверждения данного факта исследовали влияние включения доксорубицина в липосомы на сигнал флуоресценции. Известно, что, когда концентрация доксорубицина в липосомах превышает 50 мкМ , сигнал флуоресценции значительно уменьшается за счет эффекта само-тушения. Мы обнаружили тушение красной флуоресценции в очищенном от несвязавшегося лекарства образце ЛДокс, что подтверждает включение препарата в бислой. При разрушении липосом детергентом сигнал восстанавливается за счет перехода доксорубицина во внешний раствор.

Липосомы, загруженные моксифлоксацином (ЛМокс) получали методом активной (градиент сульфата аммония) и пассивной загрузки. Несвязавшийся моксифлоксацин отделяли методом диализа при 4°C с контролем сохранности липосом. Эффективность загрузки определяли по УФ-спектрам моксифлоксацина (полоса 295 нм) моксифлоксацина в пробе разрушенных детергентом Triton X-100 липосом. Результаты определения эффективности загрузки приведены в таблице 9.

Таблица 9. Липосомальные формы моксифлоксацина (ЛМокс): эффективность загрузки (%), положение основных полос поглощения в ИК-спектре, гидрадинамический диаметр по данным динамического светорассеяния и ζ -потенциал.

Способ загрузки	Эф-ность загрузки, %	$\nu\text{CH}_2\text{ as, см}^{-1}$	$\nu\text{CH}_2\text{ s, см}^{-1}$	$\nu\text{CO, см}^{-1}$	$\nu\text{PO}_2\text{ as, см}^{-1}$	d, нм	ζ -потенциал, мВ
Контроль ("пустые липосомы")		2920	2851	1739 1723 (плечо)	1225	100 ± 2 (PDI 0,154)	$-20,10\pm 0,05$
Пассивная загрузка	71 ± 2	2920	2851	1742	1220 (плечо) 1226	100 ± 2 (PDI 0,125)	$-20,10\pm 0,05$
Активная загрузка (градиент $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	91 ± 3	2920	2851	1742	1228	101 ± 2 (PDI 0,173)	$-20,07\pm 0,05$

Путем активной загрузки удалось достичь высокой эффективности загрузки для моксифлоксацина (91%). Исследуя локализацию моксифлоксацина в мембране, мы вновь остановились на методе ИК-спектроскопии Фурье. В таблице даны положения основных полос поглощения в спектре липосом. Изменения в спектре сходны с изменениями, наблюдаемыми при загрузке доксорубицина. В области поглощения карбонильной и фосфатной группы наблюдаются сдвиги, характерные для образования водородных связей, причем эти сдвиги более выражены для липосом, полученных методом активной загрузки. По-видимому, это явление связано с большим числом молекул моксифлоксацина - потенциальных лигандов для связывания с липидами.

Полученные результаты хорошо коррелируют с результатами математического моделирования, проведенного в группе E. Goormaghtigh в Свободном Университете Брюсселя. По их результатам, моксифлоксацин располагается во внутренней полости липосом близко к границе раздела фаз липид – вода, при этом центр тяжести молекулы расположен вблизи карбонильных групп липидов. Таким образом, полученные в настоящей работе экспериментальные данные согласуются с математической моделью; продемонстрирована

чувствительность метода ИК-спектроскопии Фурье для определения расположения лекарственных молекул. Это прямой, удобный и экспрессный метод исследования, в отличие от распространенных методов определения расположения лекарств в мембране, например, использование меток-репортёров в липидных мембранах.

Рапамицин - крупная гидрофобная молекула, абсолютно нерастворимая в воде. Таким образом, для загрузки рапамицина в липосомы вносили активную молекулу в органическую фазу, содержащую липиды, затем удаляли растворитель и дисперировали в буферном растворе и дополнительно обрабатывали ультразвуком (37 кГц). Особенно интересна локализация рапамицина в липосоме, поскольку до сих пор в литературе не приведены убедительные данные по этому вопросу; большинство исследователей склоняются к расположению рапамицина в гидрофобной части бислоя, однако данная молекула является очень крупной, т.е. не может не вызывать изменения и в гидрофильной части бислоя. Методом ИК-спектроскопии Фурье установлено, что встраивание рапамицина действительно влияет на состояние приводит гидрофобных цепей липидов: полосы поглощения CH_2 - групп претерпевают низкочастотные сдвиги, указывающие на замораживание подвижности ацильных цепей (таблица 10).

Таблица 10. Липосомальные формы рапамицина (ЛРапа): эффективность загрузки (%), положение основных полос поглощения в ИК-спектре, гидрадинамический диаметр по данным динамического светорассеяния и ζ -потенциал.

Способ загрузки	Эф-ость загрузки, %	νCH_2 as, cm^{-1}	νCH_2 s, cm^{-1}	νCO , cm^{-1}	νPO_2^- as, cm^{-1}	d, нм	ζ -потенциал, мВ
Контроль ("пустые липосомы")		2920	2851	1739 1723 (плечо)	1225	100±2 (PDI 0,154)	-20,10±0,05
5 минут (ультразвуковая ванна)	78±6	2917	2850	1738 1727	1225	95±2 (PDI 0,189)	-21,20±0,05
5 минут (ультразвуковая ванна)	98±2	2917	2850	1738 1727	1225 1227	93±3 (PDI 0,201)	-21,20±0,05

Влияние комплексообразования с производными хитозана на процесс высвобождения содержимого.

Важным параметром любой системы доставки лекарств является профиль высвобождения содержимого в различных средах. Метаболизм опухолевых клеток значительно отличается от метаболизма клеток здоровых. Так, например, для ряда линий опухолевых клеток обнаружен эффект «защелкивания», т.е. снижение pH до 5,5. Поэтому в данной работе был рассмотрен процесс высвобождения доксорубина и моксифлоксацина из липосом в натрий-ацетатном буферном растворе с pH 5,5 в сравнении с натрий-фосфатным буферным раствором с pH 7,4. Содержание доксорубина во внешнем растворе определяли по флуоресцентному сигналу (λ_{em} 480 нм, λ_{ex} 580 нм), содержание моксифлоксацина определяли по спектру поглощения в УФ (295 нм).

Доксорубин в течение 18-20 часов полностью высвобождается из липосом как в нейтральной, так и в кислой среде (рис. 10 а и б, кривые 1), что согласуется с литературными данными. Полимерная оболочка ПЭГ-хитозана значительно замедляет высвобождение лекарства в нейтральной среде (рис.10 а, кривые 2-5). В течение 50 часов не достигается полного высвобождения доксорубина из комплексов липосом с производными хитозана. Наиболее выражен этот эффект для комплексов липосом с ПЭГ-хитозаном 15-20 и ПЭГ-хитозаном 90-25 (рис.10 а, кривые 4 и 5), то есть для комплексов, несущих на себе наибольшее число цепей ПЭГ. Таким образом, подбором полимерной оболочки можно регулировать процесс высвобождения доксорубина из его липосомальной формы в нейтральной среде.

В кислой среде (рис. 10 б), напротив, высвобождение всего содержимого из комплексов липосом с ПЭГ-хитозаном осуществляется за 50 часов. Особенно интересен

начальный участок высвобождения (0-10 часов). Контрольный образец - липосомы без полимерной оболочки спустя 10 часов высвобождают практически весь доксорубицин (рисунок 10 б, кривая 1). С небольшим замедлением высвобождает содержимое комплекс липосом с ПЭГ-хитозан5-20 (кривая 2), полимером с самой малой молекулярной массой.

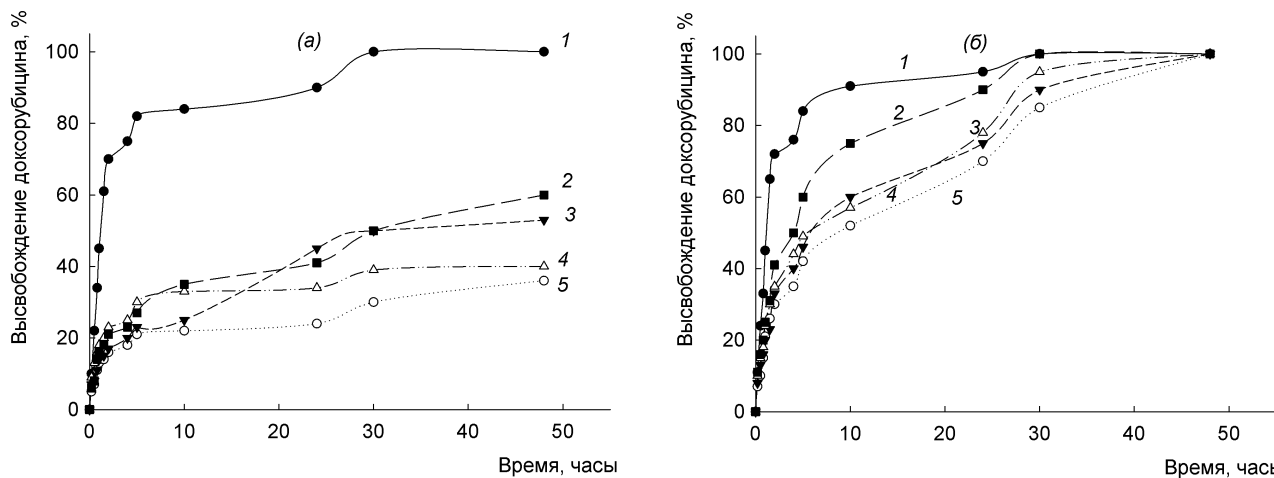


Рис. 8. Высвобождение доксорубина из липосом и их комплексов в 0,02 М натрий-фосфатном буферном растворе pH 7,4 (а) и в 0,02 М натрий-ацетатном буферном растворе pH 5,5 (б) при 37° С. Кривые соответствуют: 1 – свободные липосомы, 2 – комплекс липосом с ПЭГ-хитозан5-15, 3 – комплекс липосом с ПЭГхитозан15-5, 4 – комплекс липосом с ПЭГхитозан15-2.

Несмотря на высокую степень модификации, каждая молекула хитозана несет на себе лишь две цепи ПЭГ. Медленнее всего содержимое высвобождается из комплекса липосом с ПЭГ-хитозаном90-25 (кривая 5). По-видимому, наблюдаемое различие в кинетике высвобождения доксорубина связано с влиянием pH на эффективность электростатических взаимодействий между анионными группами липидов и аминогруппами полимера. В кислых средах аминогруппы хитозана заряжены, что определяет более высокую подвижность полимерных цепей в комплексе с липосомами, процесс высвобождения доксорубина ускоряется относительно нейтральной среды, где полимер склонен образовывать гелеподобную структуру вокруг липосомальной мембраны. Как и в нейтральной среде, в кислой среде степень ПЭГилирования и молекулярная масса хитозана влияют на скорость высвобождения доксорубина: чем больше молекулярная масса хитозана и чем больше степень ПЭГилирования, тем медленнее высвобождается содержимое (рисунок 10б). Вероятная причина наблюдаемого эффекта заключается в том, что многоточечное взаимодействие с липосомальной мембраной усиливается при увеличении ММ хитозана и гидратная оболочка существенно увеличивается в объеме при увеличении содержания ПЭГ на поверхности везикулы. Таким образом, была создана pH-чувствительная система липосомальная система доставки доксорубина, продолжительное время циркулирующая в нейтральной среде и регулируемо высвобождающая содержимое в слабокислой среде.

Для подтверждения гипотезы о влиянии молекулярной массы хитозана и степени его модификации на процесс высвобождения содержимого было изучено высвобождение моксифлоксацина из комплексов липосом с полимером с минимальным содержанием цепей ПЭГ, а именно ПЭГ-хитозан5-20, и с максимальным содержанием цепей ПЭГ - ПЭГ-хитозан90-25.

На рисунке 11 приведен ход кривых высвобождения моксифлоксацина в нейтральной и кислой среде. Как и в случае с доксорубином, из свободных липосом моксифлоксацин высвобождается в течение 10-12 часов, как в кислой, так и в нейтральной среде. Комплексообразование с ПЭГилированным хитозаном позволяет замедлить высвобождение в нейтральной среде, причем статистически значимой разницы между комплексами с ПЭГ-хитозан90-25 и ПЭГ-хитозан5-20 обнаружено не было. В кислой среде высвобождение ускоряется, наблюдается небольшое расхождение в ходе кривых для комплексов с ПЭГ-хитозаном разной молекулярной массы и степени замещения.

Таким образом, не только для доксорубина, но и для моксифлоксацина удалось создать чувствительную к рН липосомальную форму, способную на протяжении не менее 48 часов в нейтральной среде замедленно высвобождать содержимое, а в кислой среде приближаться по кинетике высвобождения к свободным липосомам.

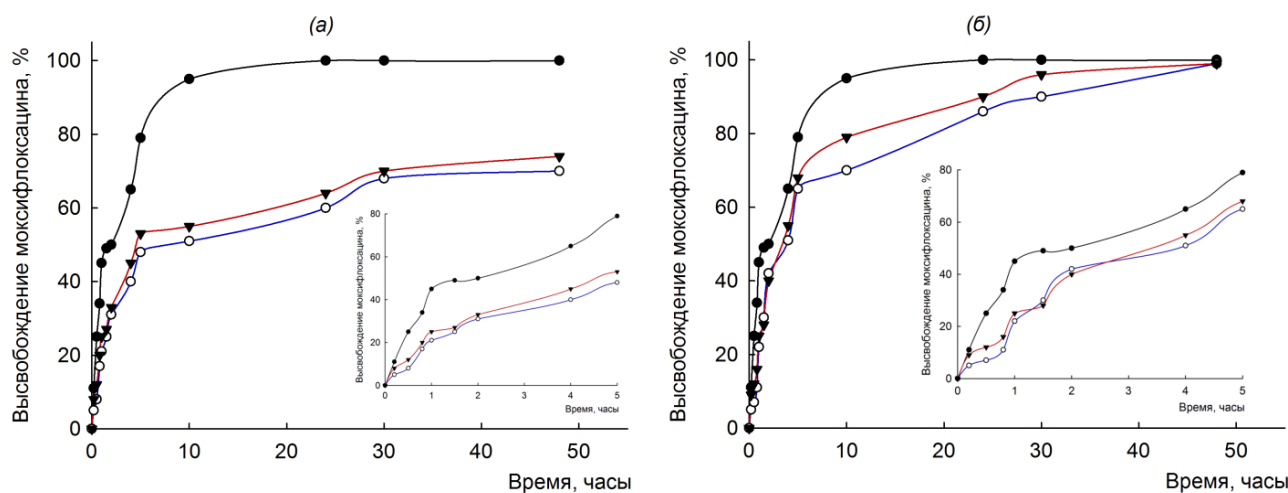


Рис. 10. Высвобождение моксифлоксацина из липосом и их комплексов в 0,02 М натрий-фосфатном буферном растворе рН 7,4 (а) и в 0,02 М натрий-ацетатном буферном растворе рН 5,5 (б) при 37° С. Кривые соответствуют: свободные липосомы (черный), комплекс липосом с ПЭГ-хитозан5-20 (красный), комплекс липосом с ПЭГхитозан90-25 (синий). На врезках даны начальные участки высвобождения.

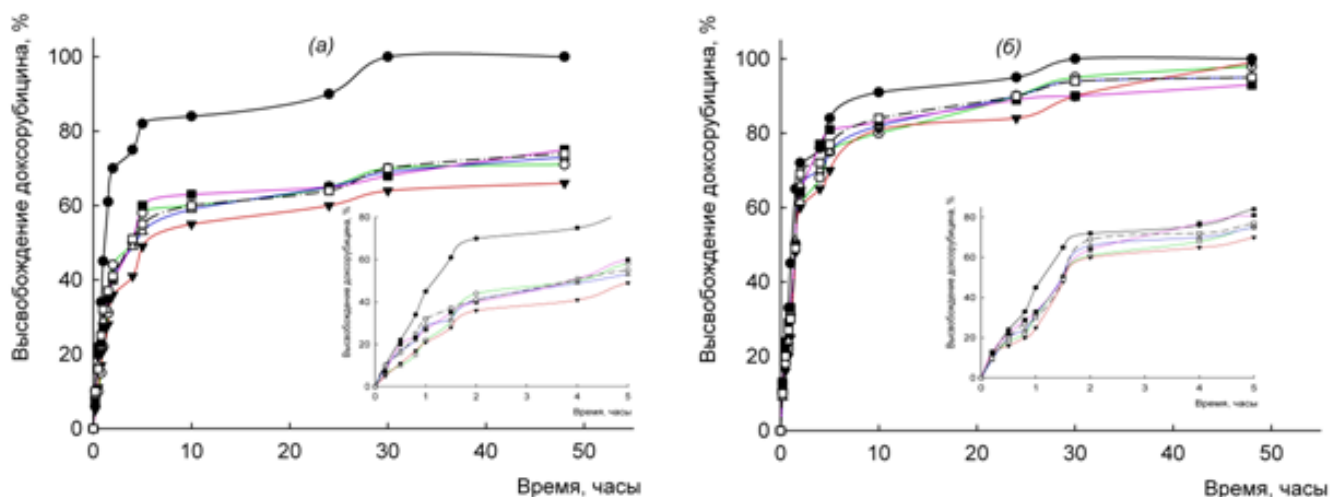


Рис. 9. Высвобождение доксорубина из липосом и их комплексов при 0,02 М натрий-фосфатном буферном растворе рН 7,4 (а) и в 0,02 М натрий-ацетатном буферном растворе рН 5,5 (б) при 37° С. Кривые соответствуют: свободные липосомы (черный), комплекс липосом с хитозаном 15 кДа (черный квадрат), с FK-хитозан90-2 (зеленый), с FK-хитозан90-19 (красный), с FK-хитозан15-20 (синий), с FK-хитозан5-20 (малиновый). На врезках даны начальные участки высвобождения.

Исследовано влияние степени замещения и молекулярной массы конъюгата хитозан-фолиевая кислота на процесс высвобождения доксорубина из липосом в нейтральной и кислой среде (рис. 12). Ключевым отличием конъюгатов FK-Хитозан от ПЭГ-хитозана является низкомолекулярный заместитель на полисахаридной молекуле. Эта структурная особенность явилась решающим фактором, влияющим на ход кривых высвобождения лекарственной субстанции. Эффект замедления высвобождения в нейтральной среде наблюдается, однако выражен для конъюгатов FK-хитозан слабее по сравнению с ПЭГ-хитозаном. По-видимому, замедление высвобождения существенным образом зависит не столько от молекулярной массы хитозана, сколько от природы заместителя при аминогруппе.

Влияние комплексообразования с производными хитозана на цитотоксичность липосомальных форм лекарств.

Исследовано влияние состава и структуры полимерной матрицы на функциональные свойства липосомальных систем. Для определения цитостатической активности ЛДокс и ЛРапа *in vitro* были выбраны три клеточные линии. Клеточная линия А549 немелкоклеточной карциномы легкого человека характеризуется нормальным уровнем фолатных рецепторов и представляется удобной системой для оценки противоопухолевой активности в качестве контрольной. Клеточная линия Сасо-2 колоректальной аденокарциномы человека и МСF-7 рака груди человека характеризуются избытком фолатных рецепторов на поверхности, что позволяет оценить эффект активного нацеливания для систем с соответствующей адресной меткой. Установлено, что все полимеры и незагруженные липосомы являются нетоксичными в концентрациях IC50, соответствующих комплексам липосом с доксорубицином.

Определены величины IC50 для ЛДокс и комплексов ЛДокс с ПЭГ-хитозан90-25 и ФК-хитозан90-19. Результаты определения приведены в таблице 11, расчет на итоговую концентрацию доксорубицина в клеточной суспензии. Полученные результаты для определения IC50 ЛДокс хорошо согласуются с литературными данными, в то время как результаты для комплексов ЛДокс с производными хитозана являются новыми.

Таблица 11. Определение IC50 липосомальных форм доксорубицина по данным МТТ-анализа (SD, n=6).

Образец	IC 50, μM А549	IC 50, μM Сасо-2
ЛДокс	0,81 \pm 0,09	1,1 \pm 0,1
ЛДокс + ПЭГ-хитозан90-25	1,10 \pm 0,07	1,12 \pm 0,09
ЛДокс + ФК-хитозан90-19	1,02 \pm 0,09	0,72 \pm 0,04

Комплексы липосомальной формы доксорубицина со всеми синтезированными полимерами были протестированы при итоговой концентрации доксорубицина 1 μM , результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12. Цитотоксичность комплексов липосомальной формы доксорубицина с производными хитозана по данным МТТ-анализа (SD, n=6).

Образец	% выживших клеток (МТТ-анализ)	
	А549	Сасо-2
ЛДокс	45 \pm 4	55 \pm 3
ЛДокс + ПЭГ-хитозан90-5	51 \pm 5	54 \pm 6
ЛДокс + ПЭГ-хитозан90-15	53 \pm 6	52 \pm 5
ЛДокс + ПЭГ-хитозан90-25	55 \pm 4	57 \pm 3
ЛДокс + ПЭГ-хитозан15-20	50 \pm 6	54 \pm 6
ЛДокс + ПЭГ-хитозан5-15	48 \pm 6	56 \pm 6
ЛДокс + ФК-Хитозан90-2	53 \pm 7	37 \pm 4
ЛДокс + ФК-хитозан90-19	52 \pm 8	35 \pm 3
ЛДокс + ФК-хитозан15-20	50 \pm 8	38 \pm 2
ЛДокс + ФК-хитозан5-20	48 \pm 7	37 \pm 3

Анализ данных МТТ-анализа показывает, что существенных отличий между комплексами ЛДокс с производными хитозана в цитотоксичности относительно линии А549 не наблюдается. Методом конфокальной микроскопии показано, что 4 часа инкубации с препаратом приводят к эффективному захвату клетками ЛДокс; спустя 24 часа наблюдается апоптоз клеток. Выраженный цитотоксический эффект, наблюдаемый для комплексов ЛДокс с производными хитозана, в совокупности с замедленным высвобождением и увеличенной стабильностью указывает на перспективность подхода функционализации поверхности липосом за счет комплексообразования. С другой стороны, линия Сасо-2, которая характеризуется гиперэкспрессией фолатных рецепторов более чувствительна к образцам, содержащим ФК-хитозан. Данное явление можно объяснить избирательным захватом клетками Сасо-2 комплексом липосом с данными конъюгатами, т.е. эффектом активного нацеливания.

Для испытаний цитотоксичности ЛРапа были выбраны клеточные линии А549 (контрольная) и МСF-7 (линия с оверэкспрессией фолатных рецепторов). Согласно литературным данным, цитотоксичность целесообразно исследовать при итоговой концентрации рапамицина 25 нМ для клеточной линии МСF-7. Результаты по определению цитотоксичности приведены в таблице 13.

Таблица 13. Цитотоксичность комплексов липосомальной формы рапамицина с производными хитозана по данным МТТ-анализа (SD, n=6).

Образец	% выживших клеток (МТТ-анализ)	
	А549	МСF-7
ЛРапа	59±2	68±8
ЛРапа + ПЭГ-хитозан90-5	49±2	62±6
ЛРапа + ПЭГ-хитозан90-25	58±3	74±7
ЛРапа + ПЭГ-хитозан15-20	58±4	68±6
ЛРапа + ФК-Хитозан90-2	53±2	53±4
ЛРапа + ФК-хитозан90-19	58±3	46±5
ЛРапа + ФК-хитозан15-20	59±3	55±4
ЛРапа + ФК-хитозан5-20	58±2	60±3

Явных зависимостей между типом полимера в комплексе и его цитотоксичность активностью для линии А549 не выявлено. Напротив, для линии МСF-7 наблюдается уменьшение доли выживших клеток при обработке комплексами, содержащими конъюгаты ФК-хитозан, причем наиболее выражен этот эффект для образца ФК-хитозан90-19, т.е. содержащего наибольшее количество остатков фолиевой кислоты.

Таким образом, на основе результатов определения цитостатической активности липосомальных форм рапамицина и доксорубицина можно предположить преимущественный захват клетками линий Сасо-2 и МСF-7 комплексов липосом с конъюгатами ФК-хитозан, что указывает на эффект активного нацеливания.

ВЫВОДЫ

1. Предложен подход к созданию функционализированных липосомальных систем доставки лекарственных препаратов на основе комплексов липосом с производными хитозана
2. Разработаны методы синтеза и характеристики ПЭГ-хитозана и конъюгатов хитозана с фолиевой кислотой с возможностью управления степенью модификации.
3. Разработан метод диагностики состояния липидной мембраны при связывании с лигандами и включении лекарственных молекул на основе ИК-спектроскопии Фурье в режиме НПВО.
4. Разработан метод расчета констант диссоциации комплексов липосом с ПЭГ-хитозаном на основе ИК-спектроскопии Фурье в режиме НПВО. Для комплексов липосом с ПЭГ-хитозан-90-25 константа диссоциации составила $1,5 \cdot 10^{-6}$ М, что позволяет в дальнейшем использовать такие комплексы в биомедицине.
5. Полимерная оболочка стабилизирует липосомы против окисления и агрегации при хранении в течение 30 дней.
6. Установлены структуры липосомальных форм лекарственных препаратов: доксорубицина, моксифлоксацина и рапамицина.
7. Разработаны липосомальные системы с регулируемой скоростью высвобождения лекарства. Установлено влияние молекулярной структуры производных хитозана на процесс высвобождения содержимого в различных условиях: увеличение содержания цепей ПЭГ в конъюгате ПЭГ-хитозан приводит к наиболее существенному замедлению высвобождения доксорубицина и моксифлоксацина.

8. Установлен эффект активного нацеливания для липосомальных форм доксорубина и рапамицина в комплексе с конъюгатами хитозана с фолиевой кислотой по отношению к клеточным линиям с оверэкспрессией фолатных рецепторов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI:

1. **Ле-Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. ПЭГ-хитозан - стабилизирующий агент для липосомальных суспензий: влияние молекулярной массы и степени ПЭГилирования на физико-химические свойства комплекса. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, 2018, Т. 59, № 2, с. 140-145.
2. **Ле-Дейген И.М.**, Скуредина А.А., Кудряшова Е.В. Системы доставки фторхинолонов: новые перспективы в борьбе с туберкулезом. *Биоорганическая химия*, 2017, Т. 43, № 5, с. 464-480.
3. **Le-Deegen I.**, Skuredina A., Uporov I., Kudryashova E. Thermodynamics and molecular insight in guest–host complexes of fluoroquinolones with β -cyclodextrin derivatives, as revealed by ATR-FTIR spectroscopy and molecular modeling experiments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, V. 409, pp. 6451–6462.
4. **Deegen I.M.**, Kudryashova E.V. New versatile approach for analysis of PEG content in conjugates and complexes with biomacromolecules based on FTIR spectroscopy *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016, V. 141, pp. 36-43.
5. **Deegen I.M.**, Seidl C., Kölmel D., Bednarek C., Heissler S., Kudryashova E.V., Bräse S., Schepers U. Novel prodrug of doxorubicin modified by stearyl spermine encapsulated into PEG-chitosan stabilized liposomes, *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 2016, V. 32, pp. 10861–10869.
6. **Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. Влияние производных хитозана на структуру анионных липосом и процесс высвобождения доксорубина. *Вестник Московского университета. Серия 2: Химия*, 2016, Т. 57, № 3, с. 154-159.
7. **Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. Структура и стабильность анионных липосом в комплексе с сополимером PEG-хитозан. *Биоорганическая химия*, 2014, Т. 40, № 5, с. 595-607.

Статьи, опубликованные в других научных изданиях:

1. **Дейген И.М.**, Сыбачин А.В., Ярославов А.А., Кудряшова Е.В. Изучение структуры комплексов поликатиона с анионными липосомами в гелеобразной и жидкокристаллической фазе методом ИК-спектроскопии. *Вестник МИТХТ*, 2012, Т. 7, с. 96-96.

Патенты на изобретения:

1. **Ле-Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. Патент на изобретение RU 2642786 «Стабилизатор липосомальных суспензий». Дата регистрации 26.01.2018.

Тезисы докладов конференций:

1. **Ле-Дейген И.М.** Стабилизированные липосомальные контейнеры для доставки лекарственных веществ. Электронный сборник тезисов IX международной конференции "Инновации в химии: достижения и перспективы" форума студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов - 2018", Москва, Россия, 2018.
2. **Ле-Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. Стабилизированные липосомальные контейнеры для доставки лекарственных веществ с малой биодоступностью и биосовместимостью.

Сборник тезисов XI Конкурса проектов молодых ученых в рамках выставки Химия 2017, Москва, Россия, 24 октября 2017, с.40.

3. Skuredina A.A., Kudryashova E.V., **Deygen I.M.**, Klyachko N.L. SCF technique for encapsulation of moxifloxacin and levofloxacin with biodegradable polymers of different nature. Электронный сборник тезисов Book of abstracts Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications. June 25-30, 2017, Moscow Region, Russian Federation.
4. **Дейген И.М.** Производные хитозана – перспективные биополимеры для регуляции структурно-функциональных свойств липосомальных систем. Электронный сборник тезисов международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 11-15 апреля 2016.
5. **Deygen I.M.**, Kudryashova E.V. Электронный сборник тезисов международной научной конференции Targeted liposomal container for colorectal adenocarcinoma treatment. Modern Drug Discovery & Development Summit (M3D), Philadelphia, США, 9-11 сентября 2015.
6. **Deygen I.M.**, Kudryashova E.V. FTIR-spectroscopy as a highly effective method to investigate liposomal drug delivery systems. Электронный сборник тезисов International Conference "Biocatalysis-2015: Fundamentals and Applications", Moscow region, Russia, 21-26 июня 2015.
7. **Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. ИК-спектроскопия Фурье – метод анализа систем, содержащих ПЭГилированные биомолекулы. Электронный сборник тезисов XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Москва, Россия, 13-17 апреля 2015.
8. **Deygen I.M.**, Kudryashova E.V. New approach for pegylation degree analysis in biomacromolecules by using ftir spectroscopy. Электронный сборник тезисов VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: Состояние и перспективы развития», Москва, Россия, 17-20 марта 2015.
9. **Deygen I.M.**, Kudryashova E.V. Nanocontainers based on anionic liposomes complexes for antitumor drug delivery. Электронный сборник тезисов международной конференции INASCON, Brogaarden, Denmark, Дания, 2014.
10. **Дейген И.М.**, Кудряшова Е.В. Применение ИК-спектроскопии для изучения структуры и стабильности комплексов липосом с полимерами различной молекулярной архитектуры. Электронный сборник тезисов международной конференции XI Международная конференция "Спектроскопия координационных соединений", Туапсе, 2014.